



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE-UFS**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (PROCTA)**

FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE  
FRUTAS: ACEROLA (*Mapighia glabra* L.), MANGABA (*Harconia speciosa*) E  
GRAVIOLA (*Annona muricata*) PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

JULIANA DOS SANTOS LIMA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Cristina Lins de Aquino Santana

Orientadora

São Cristóvão / SE

Fevereiro – 2014

FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE  
FRUTAS: ACEROLA (*Mapighia glabra* L.), MANGABA (*Harconia speciosa*) E  
GRAVIOLA (*Annona muricata*) PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

JULIANA DOS SANTOS LIMA

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
como parte das exigências para a  
obtenção do título de MESTRE EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Cristina Lins de Aquino Santana

Orientadora

São Cristóvão / SE

Fevereiro – 2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE-UFS**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (PROCTA)**

**PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE**  
**MESTRADO**

**Autora:** Juliana dos Santos Lima

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Luciana Cristina Lins de Aquino Santana

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Cristina Lins de Aquino Santana  
Orientadora -PROCTA - UFS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lisiane dos Santos Freitas  
Examinador Externo- Departamento de Química- UFS

---

Prof. Dr. Narendra Narain  
Examinador Interno - PROCTA– UFS

São Cristóvão – SE, 26 de Fevereiro de 2014

L732f

Lima, Juliana dos Santos

Fermentação em estado sólido de resíduos do processamento de frutas : acerola (*Mapighia glabra* L.), mangaba (*Harconia speciosa*) e graviola (*Annona muricata*) para a obtenção de compostos bioativos / Juliana dos Santos Lima ; orientadora Luciana Cristina Lins de Aquino Santana. – São Cristóvão, 2014.  
100 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Resíduo de fruta. 3. Cromatografia líquida. 4. Microorganismo. 5. Fermentação – Estado sólido. I. Santana, Luciana Cristina Lins de Aquino, orient. II. Título

CDU: 664.8:663.15

## **VITAE DO CANDIDATO**

Juliana dos Santos Lima, filha de Olivio Oliveira Lima e Berenice dos Santos Lima, nascida em Serrinha/Ba em 29 de março de 1987.

Iniciou o curso de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado da Bahia em 2006, concluindo em 2010.

Foi estagiária no Laboratório de Biologia Experimental, na linha de pesquisa Microbiologia de Alimentos, pela Universidade do Estado da Bahia de 2008 a 2010. Bolsita do CNPq de 2009 a 2010, com projeto de pesquisa em isolamento e identificação de bactérias patogênicas em carcaças de frangos e integrante do grupo de pesquisa de análise microbiológica da água, alimentos e solos do Território Agreste de Alagoinhas/Litoral Norte.

Em março de 2012, iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em nível de mestrado acadêmico na Universidade Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão-SE.

## AGRADECIMENTOS

Ao ser supremo que me permitiu forças pra trilhar esse novo caminho cheio de desafios, aprendizagens, amadurecimento, e me sustentou até aqui. Obrigado Deus por tua fidelidade!!!

Aos melhores pais do mundo que com carinho e amor incondicional, estavam presentes comigo, em cada momento de lágrimas e conquistas durante a caminhada. Amo vocês Olivio e Berenice!

Aos meus familiares por me ajudarem em oração, apoio, incentivo e confiança depositada em mim.

A professora Luciana Cristina, pela dedicação, orientação e confiança depositada a mim com a escolha do projeto e apoio durante toda a pesquisa.

As minhas companheiras de jornada, por me ajudarem a superar medos, limites e extrair de mim um sorriso sincero, uma palavra amiga, uma oração de paz, força e coragem, enfim sem vocês comigo, eu não chegaria até aqui... Elis Augusta, Juliana Matos, Alana, Sharlene, Allana e Eriane.

A técnica do LAF, Gabriela Barbosa pela ajuda na resolução das técnicas e sua disponibilidade e atenção durante as análises cromatográficas.

Aos professores do mestrado, pelos ensinamentos e aprendizados compartilhados, sugestões, puxões de orelha e um afago nos momentos em que mais necessitei.

A Prof<sup>a</sup> Lisiane Freitas pela disponibilidade do laboratório, e das orientandas, na tentativa das análises de CG.

A Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade de realizar meu trabalho e poder concluir mais uma meta.

A CAPES pela concessão da bolsa, auxílio fundamental para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos anjos em forma de amigo que nesses 2 anos, me ajudaram em oração, apoio, carinho e amizade incondicional, fazendo com que eu não desistisse de seguir.

Enfim a cada um que contribuiu direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui, o meu muito obrigado!!!

## RESUMO

Os resíduos de frutas devido ao elevado teor nutricional, apresentam potencial para serem utilizados *in natura* ou como substrato em processos biotecnológicos. A fermentação em estado sólido (FES) tem sido apontada nos últimos anos como uma estratégia eficiente para de compostos bioativos a partir de resíduos agroindustriais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho, foi avaliar o potencial de utilização de resíduos de acerola (*Malpigia glabra*) mangaba (*Harconia speciosa*) e graviola (*Annona muricata*), como subtrato para a produção de compostos bioativos (fenólicos e flavonóides totais) a partir da FES com *Aspergillus niger*. Inicialmente vários solventes foram testados para a extração dos compostos nos resíduos de frutas, sendo selecionado a acetona a 80%. Dentre os resíduos, o de acerola apresentou maior teor de compostos fenólicos e flavonóides totais, porém devido a falta de adaptação do micro-organismo ao resíduo, as fermentações foram realizadas com o resíduo de graviola variando-se a temperatura e umidade do substrato segundo delineamento composto central rotacional. A FES do resíduo de graviola proporcionou um aumento de compostos fenólicos totais em relação ao resíduo não fermentado, quando utilizado temperatura de fermentação de 40°C e umidade de resíduo de 30% em 120 h de fermentação. Contudo, a maior capacidade antioxidante foi obtida no fermentado quando utilizada temperatura de 30°C e 50% de umidade do resíduo. Nos resíduos fermentados com maiores teores de compostos fenólicos e flavonóides totais, os quais corresponderam aos fermentados 2 (Temperatura 47°C/Umidade do resíduo 36%), 5 (Temperatura 30°C/Umidade do resíduo 50%), 7 (Temperatura 40°C/Umidade do resíduo 30%) e 8 (Temperatura 40°C/Umidade do resíduo 70%) foi identificado o composto ácido protocatecuico não presente no resíduo de graviola não fermentado. Um composto não identificado foi detectado no fermentado 8 com concentração bem maior do que a obtida no resíduo de graviola não fermentado. Diante do exposto, o resíduo de graviola demonstrou potencial para ser usado como substrato na produção de compostos bioativos por fermentação em estado sólido, tornando-se uma alternativa interessante para futuras aplicações industriais

**Palavras chave:** resíduo de fruta, fermentação em estado sólido, cromatografia líquida, micro-organismo.

## ABSTRACT

The fruit waste due to the high nutritional content, have the potential to be used fresh or as substrate in biotechnological processes. The solid state fermentation (SSF) has been identified in recent years as an effective strategy for bioactive compounds from agro-industrial residues. In this context, the aim of this work was to evaluate the potential use of waste acerola (*Malpigia glabra*) mangaba (*Harconia speciosa*) and soursop (*Annona muricata*) as substrate for the production of bioactive compounds (phenolics and flavonoids) from SSF with *Aspergillus niger*. Initially various solvents were tested for extraction of compounds in fruit waste, and selected acetone at 80%. Among the waste, acerola showed a higher content of phenolic compounds and flavonoids, but because of the lack of adaptation of the micro-organism to the residue, the fermentations were carried out with the residue of soursop varying the temperature and humidity of residue according experimental design central composite rotational. The SSF of soursop residue resulted in higher total phenolic compounds concentration than the obtained on unfermented waste, when used fermentation temperature of 40 ° C and humidity of 30% residue at 120 h of fermentation. However, the greatest antioxidant capacity was obtained when using temperature at 30°C and 50% humidity of residue. In the fermented 2 (47 ° C Temperature / Humidity 36% residue), 5 (30 ° C Temperature / Humidity residue of 50%), 7 (Temperature 40 ° C / humidity 30% of the residue) and 8 (temperature 40 ° C / humidity 70% of the residue) which showed higher concentrations of phenolic compounds and flavonoids, the protocatechuic acid compound, not present in the unfermented soursop residue, was identified. An unidentified compound was detected in fermented 8 with highest concentration than that obtained in the unfermented soursop residue. Consequently, the soursop residue showed potential to be used as substrate for the production of bioactive compounds in solid state fermentation, making it an interesting alternative for future industrial applications.

**Keywords:** fruit residue, state solidfermentation, liquid chromatography, microorganism.

## SUMÁRIO

|                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO.....</b>                                                                              | <b>7</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                            | <b>8</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                       | <b>15</b> |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                                        | <b>16</b> |
| <b>2.1. Objetivo Geral.....</b>                                                                 | <b>16</b> |
| <b>2.2. Objetivos Específicos .....</b>                                                         | <b>17</b> |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                           | <b>17</b> |
| <b>3.1. Compostos Bioativos.....</b>                                                            | <b>17</b> |
| <b>3.2. Métodos de avaliação da atividade antioxidante .....</b>                                | <b>23</b> |
| 3.2.1. Método do radical DPPH .....                                                             | 24        |
| 3.2.2. Método do radical ABTS <sup>o+</sup> .....                                               | 25        |
| 3.2.3 Método FRAP .....                                                                         | 26        |
| 3.2.4. Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio).....                        | 27        |
| <b>3.3. Fontes de obtenção de compostos fenólicos e flavonóides .....</b>                       | <b>29</b> |
| <b>3.4. Resíduos de frutas.....</b>                                                             | <b>31</b> |
| <b>3.5. Obtenção de compostos fenólicos através de fermentação em estado sólido.....</b>        | <b>33</b> |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                             | <b>38</b> |
| <b>4.1. Obtenção dos resíduos de frutas.....</b>                                                | <b>38</b> |
| <b>4.2. Tratamento dos resíduos de frutas.....</b>                                              | <b>38</b> |
| <b>4.3. Micro-organismo.....</b>                                                                | <b>38</b> |
| <b>4.4. Metodologia Experimental.....</b>                                                       | <b>39</b> |
| 4.4.1. Caracterização Físico-Química dos Resíduos de Acerola, Graviola e Mangaba.....           | 39        |
| 4.4.2. Seleção de solventes para a extração de compostos bioativos dos resíduos de frutas ..... | 40        |

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.5. Fermentação do resíduo de fruta para a obtenção de compostos bioativos .....</b>                                   | <b>40</b> |
| <b>4.6. Quantificação de compostos fenólicos e flavonóides por espectrofotometria .....</b>                                | <b>41</b> |
| 4.6.1. Quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) pelo Método de Folin-Ciocalteu.....                               | 41        |
| 4.6.2. Quantificação de Flavonóides Totais (FT).....                                                                       | 42        |
| <b>4.7. Determinação da Atividade Antioxidante (AA) .....</b>                                                              | <b>42</b> |
| 4.7.1. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de DPPH.....                                                     | 42        |
| 4.7.2. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de ABTS <sup>o+</sup> .....                                      | 43        |
| 4.7.3. Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP) .....                                                                 | 43        |
| <b>4.8. Identificação e Quantificação de compostos bioativos por HPLC .....</b>                                            | <b>44</b> |
| 4.8.1. Extração de compostos bioativos .....                                                                               | 44        |
| 4.8.2. Análise dos compostos bioativos através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....                     | 44        |
| 4.8.3. Identificação e quantificação dos compostos bioativos .....                                                         | 45        |
| <b>4.9. Análise estatística .....</b>                                                                                      | <b>45</b> |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                     | <b>45</b> |
| <b>5.1. Caracterização físico-química das farinhas dos resíduos .....</b>                                                  | <b>45</b> |
| <b>5.2. Influência dos solventes na extração dos compostos bioativos nos resíduos de frutas .....</b>                      | <b>48</b> |
| <b>5.3. Potencial dos resíduos de frutas para a obtenção de compostos bioativos por fermentação em estado sólido .....</b> | <b>52</b> |
| <b>5.4. Influência de parâmetros na produção de compostos bioativos por FES do resíduo de graviola .....</b>               | <b>60</b> |
| <b>5.5. Capacidade antioxidante dos fermentados de resíduos de graviola.....</b>                                           | <b>62</b> |
| <b>5.6. Identificação e quantificação de compostos bioativos .....</b>                                                     | <b>65</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                  | <b>67</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                  | <b>68</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Grupo de Flavonóides, seus componentes bioativos e fontes alimentares. ....                                                                                                                                                             | 19 |
| <b>Tabela 2:</b> Classe de compostos fenólicos encontrados em frutas e vegetais. ....                                                                                                                                                                    | 23 |
| <b>Tabela 3:</b> Pesquisas sobre a obtenção de compostos bioativos por Fermentação em Estado Sólido.....                                                                                                                                                 | 36 |
| <b>Tabela 4:</b> Matriz do delineamento composto central rotacional ( $2^2 + 4$ pontos axiais + 3 pontos centrais) empregado no estudo de produção compostos bioativos por FES. ....                                                                     | 41 |
| <b>Tabela 5:</b> Caracterização físico-química das farinhas dos resíduos de frutas .....                                                                                                                                                                 | 45 |
| <b>Tabela 6:</b> Teor de compostos fenólicos e flavonóides totais equivalentes ao ácido gálico e quercetina nos extratos das farinhas dos resíduos de graviola, acerola e mangaba (mg EAG/g seco de resíduo e mg de quercetina /g seco de resíduo) ..... | 49 |
| <b>Tabela 7:</b> Níveis decodificados e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial e produção de compostos de fenólicos e flavonóides totais durante a fermentação do resíduo de graviola.....                                         | 56 |
| <b>Tabela 8:</b> Análise de variância para produção de fenóis por FES a partir do resíduo de graviola. ....                                                                                                                                              | 62 |
| <b>Tabela 9:</b> CFT e capacidade antioxidante dos fermentados obtidos em 120 h de FES e do resíduo de graviola não fermentado.....                                                                                                                      | 63 |
| <b>Tabela 10:</b> Compostos bioativos identificados no resíduo de graviola e nos fermentados obtidos em 120 h de fermentação através das análises em HPLC.....                                                                                           | 66 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1 :</b> Estrutura química dos principais flavonóides (NUNO, 2012).....                                                                                                                                                                                                                                  | 20 |
| <b>Figura 2:</b> Exemplos de compostos fenólicos simples pertencentes ao grupo dos ácidos (A) hidroxibenzóico e (B) hidroxicinâmico (MORTON <i>et al.</i> , 2000) .....                                                                                                                                           | 21 |
| <b>Figura 3:</b> Estabilização do radical livre DPPH mostrando a forma radicalar (1) e não radicalar (2) Rufino <i>et al.</i> (2007) .....                                                                                                                                                                        | 25 |
| <b>Figura 4:</b> Formação do Radical ABTS Rufino <i>et al.</i> (2007) .....                                                                                                                                                                                                                                       | 26 |
| <b>Figura 5:</b> Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5 triazina) com $Fe^{2+}$ Rufino <i>et al.</i> (2007).....                                                                                                                                                                                   | 27 |
| <b>Figura 6:</b> Reação de quantificação de fenólicos totais por reagente de Folin-Ciocalteu.....                                                                                                                                                                                                                 | 28 |
| <b>Figura 7:</b> Desaminação da L-fenilalanina pela PAL, formando a ácido cinâmico (VERPOORTE <i>et al.</i> , 2007). .....                                                                                                                                                                                        | 29 |
| <b>Figura 8:</b> Esquema da biossíntese de compostos antioxidantes a partir do precursor fenilalanina necessário para ocorrer a biossíntese de trans-cinâmico pelos vegetais. Baseado em Verpoorte <i>et al.</i> (2007).....                                                                                      | 30 |
| <b>Figura 9:</b> Crescimento de <i>Aspergillus niger</i> utilizando como suporte sólido casca de maracujá. Disponível em:< <a href="http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/valor20">http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/valor20</a> > .....                                                                | 34 |
| <b>Figura 10:</b> Farinha do resíduo de Acerola (1) e Farinha do resíduo de Graviola (2) .....                                                                                                                                                                                                                    | 38 |
| <b>Figura 11:</b> Concentração de fenólicos totais nos extratos das farinhas de graviola, acerola e mangaba utilizando os seguintes solventes: 1= Etanol PA; 2=Etanol 60%; 3=Etanol 80%; 4=Metanol 50%; 5=Metanol 60%; 6=Metanol 80%;7=Acetona 50%; 8=Acetona 60%; 9=Acetona 70%; 10=Acetona 80% e 11=Água.....   | 50 |
| <b>Figura 12:</b> Concentração de flavonóides totais nos extratos das farinhas de graviola, acerola e mangaba utilizando os seguintes solventes: 1= Etanol PA; 2=Etanol 60%; 3=Etanol 80%; 4=Metanol 50%; 5=Metanol 60%; 6=Metanol 80%;7=Acetona 50%; 8=Acetona 60%; 9=Acetona 70%; 10=Acetona 80% e 11=Água..... | 50 |

|                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 13:</b> Concentração de compostos fenólicos totais nos fermentados de acerola durante 192 horas de fermentação utilizando <i>Aspergillus niger</i> .....                                              | 53 |
| <b>Figura 14:</b> Quantificação de compostos fenólicos totais durante a FES por 360 h do resíduo de graviola utilizando <i>Aspergillus niger</i> . Experimentos de 1 a 6 .....                                  | 57 |
| <b>Figura 15:</b> Quantificação de compostos fenólicos totais durante a FES por 360 h do resíduo de graviola utilizando <i>Aspergillus niger</i> . Experimentos de 7 a 11. ....                                 | 57 |
| <b>Figura 16:</b> Quantificação de flavonóides totais durante a FES por 360 h do resíduo de graviola utilizando <i>Aspergillus niger</i> . Experimentos de 1 a 5. ....                                          | 58 |
| <b>Figura 17:</b> Quantificação de flavonóides totais durante a FES por 360 h do resíduo de graviola utilizando <i>Aspergillus niger</i> . Experimentos de 6 a 11. ....                                         | 58 |
| <b>Figura 18:</b> Gráfico de pareto da obtenção de compostos fenólicos por fermentação em estado sólido. U= umidade, T = temperatura. ....                                                                      | 61 |
| <b>Figura 19:</b> Capacidade antioxidante dos extratos fermentados e não fermentado da farinha de graviola, através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP. ....                                                         | 63 |
| <b>Figura 20:</b> Curva de calibração de ácido gálico. ....                                                                                                                                                     | 93 |
| <b>Figura 21 :</b> Curva de calibração da quercetina .....                                                                                                                                                      | 93 |
| <b>Figura 22:</b> Curva de calibração do FRAP .....                                                                                                                                                             | 94 |
| <b>Figura 23:</b> Curva de calibração do padrão ácido gálico .....                                                                                                                                              | 94 |
| <b>Figura 24:</b> Curva de calibração do padrão ácido ferúlico.....                                                                                                                                             | 95 |
| <b>Figura 25:</b> Curva de calibração do padrão p-cumárico.....                                                                                                                                                 | 95 |
| <b>Figura 26:</b> Curva de calibração do padrão ácido vanílico .....                                                                                                                                            | 96 |
| <b>Figura 27:</b> Extrato do resíduo de graviola analisado à 310 nm. (A) Picos 2 e 6 correspondem ao composto não identificado (pico próximo ao do composto ácido ferúlico) e p-cumárico, respectivamente. .... | 96 |

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 28:</b> Cromatograma (B) extrato do fermentado 5. Pico 2 corresponde ao composto ácido ferúlico obtido à 310 nm. Cromatograma (C) extrato do fermentado 5. Pico 3 corresponde ao composto ácido protocatecuico obtido à 254 nm. .... | 97 |
| <b>Figura 29:</b> Cromatograma (D) extrato do fermentado 2. Pico 3 corresponde ao ácido protocatecuico obtido à 254 nm. ....                                                                                                                   | 97 |
| <b>Figura 30:</b> Cromatograma (E) extrato do fermentado 7. Pico 2 corresponde ao ácido ferúlico obtido em 310 nm. Cromatogramas (F) extrato do fermentado 7. Pico 3 corresponde ao ácido protocatecuico obtido à 254 nm. ....                 | 98 |
| <b>Figura 31:</b> Cromatograma (G) extrato do fermentado 8. Pico do composto não identificado obtido à 254 nm. ....                                                                                                                            | 98 |
| <b>Figura 32:</b> Cromatograma do Mix de padrões analisados .....                                                                                                                                                                              | 99 |

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil vem se destacando em nível mundial como um importante produtor e consumidor de frutas, especialmente as tropicais e subtropicais como: acerola, graviola e mangaba, dentre outras. Segundo a FAO (2010), é o terceiro maior país produtor de frutas do mundo, as quais apresentam um grande potencial econômico e nutricional. No processamento das frutas, grande parte é descartada por não possuírem mais nenhum proveito, gerando dessa forma os resíduos agroindustriais. Uma alternativa viável para a diminuição no acúmulo desses resíduos é a sua utilização como substrato em processos fermentativos, contribuindo assim, com a redução dos problemas de poluição ambiental (GHOSHAL *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2011; GRAMINHA *et al.*, 2008; SOCCOL, 2003).

Os resíduos de frutas apresentam altos valores nutricionais, com potencial para serem convertidos em produtos comerciais ou matérias primas para processos secundários, bem como em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos voláteis e principalmente compostos bioativos, tais como carotenóides, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, saponinas, flavononas, vitamina E e C, isoflanóides, antocianinas e aminoácidos, os quais se destacam por sua grande biodisponibilidade nas frutas, vegetais e hortaliças incorporados à dieta alimentar (MARTINS *et al.*, 2011; VENDRUSCOLO *et al.*, 2007; PANDEY *et al.*, 2006).

Atualmente, uma crescente atenção tem sido empregada ao uso de compostos bioativos, devido à sua capacidade de promover os benefícios à saúde humana (BAGETTI *et al.*, 2009; CASSANO *et al.*, 2008) tais como a redução da incidência de várias doenças degenerativas como o cancro e diabetes (CONFORTI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009a); redução de fatores de risco de doenças cardiovasculares (JIMENEZ *et al.*, 2008), antioxidantes, anti-mutagênica, anti-alérgicos, efeitos anti-inflamatórios e anti-microbiana (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; HAM *et al.*, 2009; PARVATHY *et al.*, 2009; ÁJILA *et al.*, 2011), entre outros.

Nos últimos anos, com o intuito de intensificar a produção de compostos bioativos através de resíduos agroindustriais, processos biotecnológicos tem sido desenvolvido por meio da fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação semi-sólida (FSS), onde os micro-organismos (bactérias, fungos ou leveduras) utilizam os componentes nutritivos do

substrato sólido para a obtenção de vários metabólitos de interesse (TORINO *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2011).

As atuais linhas de pesquisa em FES são o enriquecimento proteico de resíduos agroindustriais, a destoxificação de resíduos, por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes que impedem sua aplicação intensiva; produção de compostos de alto valor agregado, como enzimas e diferentes metabólitos (MARTINS *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012a; SANTOS *et al.*, 2012a; SILVA *et al.*, 2012b; PANDEY *et al.*, 2006). A FES têm sido empregada para a produção de polifenóis a partir de resíduos de bagaço de maçã (ÁJILA *et al.*, 2011), para aumentar as propriedades antioxidantes de resíduos de sementes de lentilha (TORINO *et al.*, 2013) e para aumentar compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de grãos trigo (LEE, *et al.*, 2008b; SINGH *et al.*, 2010).

O nordeste brasileiro, especialmente o estado de Sergipe se destaca por apresentar condições climáticas favoráveis à produção de diversas frutas nativas (mangaba, cacau, mamão) e exóticas (graviola, acerola, jaca). Sergipe é considerado um dos maiores produtores de mangaba do Nordeste, representando 55% da sua produção e comercialização, gerando na indústria durante o processamento das frutas, resíduos ricos em nutrientes, que poderiam ser aproveitados como substratos em processos fermentativos. Neste contexto, visando agregar valor aos resíduos de frutas, com significativa redução do impacto ambiental, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de utilização de resíduos de acerola (*Malpighia glabra*), mangaba (*Harconia speciosa*) e graviola (*Annona muricata*) como substrato biotecnológico para a produção de compostos bioativos (fenólicos e flavonóides) de interesse para a indústria de alimentos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o potencial de utilização de resíduos de acerola (*Malpighia glabra*), mangaba (*Harconia speciosa*) e graviola (*Annona muricata*) para a produção de compostos bioativos (compostos fenólicos e flavonóides), de interesse para a indústria de alimentos, através de fermentação em estado sólido.

## 2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Obtenção e caracterização das farinhas dos resíduos de acerola, mangaba e graviola;
- ✓ Selecionar diferentes solventes para extração de compostos fenólicos e flavonóides totais dos resíduos de frutas;
- ✓ Realizar a fermentação em estado sólido dos resíduos de acerola, mangaba e graviola utilizando o micro-organismo *Aspergillus niger* e selecionar o resíduo com maior potencial para a produção de compostos bioativos (fenólicos e flavonóides totais);
- ✓ Verificar a influência dos parâmetros umidade do resíduo e temperatura na produção de compostos fenólicos e flavonóides totais a partir da FES do resíduo selecionado;
- ✓ Determinar o potencial antioxidante dos fermentados obtidos a partir das melhores condições para a FES;
- ✓ Identificar e quantificar por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) potenciais compostos bioativos presentes nos fermentados obtidos a partir das melhores condições para a FES.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. Compostos Bioativos

Os compostos bioativos são extra constituintes nutricionais que ocorrem naturalmente em pequenas quantidades presentes nos vegetais, em especial nas frutas ricas em propriedades fitoquímicas, tais como a acerola, goiaba, maçã, laranja, pitanga, umbu, coco verde, groselha, acaí, morango, romã, uva entre outros. Apresentam-se como substâncias capazes de proporcionar benefícios à saúde, prevenindo ou tratando doenças até mesmo favorecendo o funcionamento do organismo (MELO & ANDRADE, 2010; MARTINS *et al.*, 2011; VERONEZI & JORGE, 2012). Os compostos bioativos mais

comumente encontrados em frutas e hortaliças são as substâncias fenólicas, vitaminas C e E, antocianinas e carotenóides, os quais são conhecidos como potentes antioxidantes e antagonistas naturais de patógenos. Estas substâncias encontram-se nos vegetais na forma livre ou ligadas a açúcares e proteínas polifenólicas (SILVA *et al.*, 2012; CATANEO *et al.*, 2008). Deve-se ressaltar que essas propriedades antioxidantes não são encontradas apenas na polpa de frutas, mas em sua cascas e sementes também, merecendo relevância e destaque demonstrado que tal atividade é frequentemente superior por possuírem teor elevado de compostos fenólicos (SOONG & BARLOW, 2004).

Sabe-se que os antioxidantes naturais possuem a capacidade de melhorar a qualidade e a estabilidade dos alimentos, protegerem efetivamente o organismo contra os processos oxidativos que ocorrem naturalmente, sua utilização é economicamente mais viável e proporcionam benefícios adicionais à saúde dos consumidores por meio dos efeitos funcionais dos compostos bioativos polifenólicos (CATANEO *et al.*, 2008). Nos sistemas biológicos, os antioxidantes são conceituados como qualquer substância presente em baixas concentrações quando comparadas à de um substrato oxidável, que retarda ou previne a ação oxidante deste substrato. De acordo com a ANVISA (2009) os antioxidantes são substâncias que retardam o aparecimento e alteração oxidativa no alimento, podendo ser classificados como primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

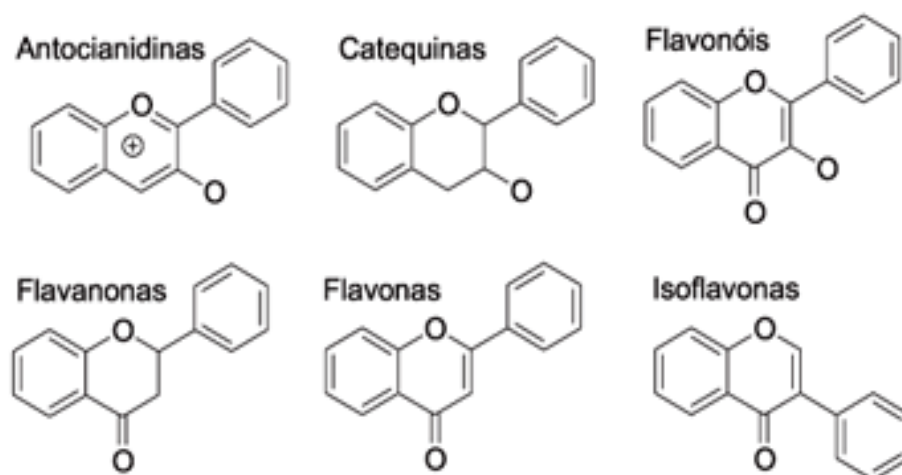
Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, são considerados antioxidantes naturais e representam um importante grupo de compostos bioativos em alimentos. São classificados em: fenóis simples, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides. Dentro desse grupo de compostos estão incluídos os flavonóides, isoflavononas, antocianidinas, catequinas, tocoferóis, ácidos fenólicos, taninos, entre outros. Na Tabela 1 estão apresentados alguns grupos de flavonóides, seus componentes bioativos e fontes alimentares. Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de plantas, sendo responsável por mais da metade dos oito mil compostos fenólicos que ocorrem naturalmente, encontrando-se presentes na dieta alimentar, sendo responsáveis por propriedades organolépticas de cor e sabor, além das propriedades biológicas benéficas à saúde (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; ÁJILA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2011; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

**Tabela 1:** Grupo de Flavonóides, seus componentes bioativos e fontes alimentares.

| Grupos       | Componentes              | Fonte alimentar                       |
|--------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Flavonas     | Apigenina                | Cascas de maçãs                       |
|              | Chrisina                 | Cerejas                               |
|              | Kaempferol               | Brócolis                              |
|              | Luteolina                | Peles de frutas                       |
|              | Miricetina               | Cranberries                           |
|              | Rufina                   | Uvas                                  |
|              | Sibelina                 | Alface                                |
|              | Quercetina               | Oliva<br>Alho                         |
| Flavononas   | Fisetina                 | Frutas cítricas                       |
|              | Hesperetina              | Peles de frutas cítricas              |
|              | Narigina                 |                                       |
|              | Naringenina              |                                       |
|              | Taxifolina               |                                       |
| Catequinas   | Catequina                | Vinho tinto                           |
|              | Epicatequina             | Chá                                   |
|              | Epigallocatequina galate |                                       |
| Antocianinas | Cianidina                | Cerejas                               |
|              | Delfinidina              | Uvas                                  |
|              | Malvidina                | Raspberries                           |
|              | Pelargonidina            | Uvas vermelhas                        |
|              | Peonidina                | Morangos                              |
|              | Petunidina               | Chá                                   |
|              |                          | Peles de frutas com pigmentos Escuros |

Fonte: ROCHA, 2011

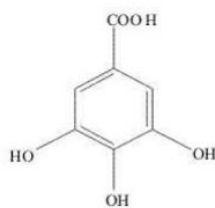
A estrutura básica destes compostos (Figura 1) é formada pelo anel benzênico com hidroxilas associadas diretamente a estrutura cíclica, apresentando-se na maioria das vezes conjugados com mono e polissacarídeos ligados a um ou mais grupos fenólicos. A ampla categoria de compostos pode ser classificada como polifenóis ou fenóis simples, tendo como base o número de subunidades fenólicas presentes em sua estrutura (NUNO, 2012; SOUSA *et al.*, 2012). Em alguns casos podem apresentar características lipofílicas como os tocoferóis e hidrofílicas como a quercetina.



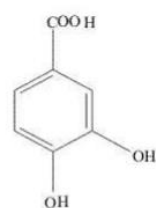
**Figura 1:** Estrutura química dos principais flavonóides (NUNO, 2012).

Os ácidos fenólicos estão representados por substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos, caracterizando-se por possuir um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo a estes propriedades antioxidantes, tanto para o alimento como para o organismo (ABE *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.* 2007). É sabido que este tipo de composto está envolvido na formação de lignina, polímero presente na parede celular de plantas, fato que explica a abundância em cascas e sementes de frutas, bem como em caules e folhas de vegetais, são divididos em dois grandes grupos: os ácidos hidroxicinâmicos e hidrobenzênicos como representados na **Figura 2** (MORTON *et al.*, 2000).

A)

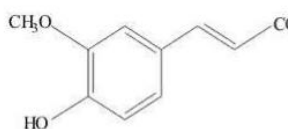


ácido gálico

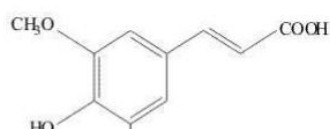


ácido protocatéquico

B)



ácido ferúlico



ácido sinápico

**Figura 2:** Exemplos de compostos fenólicos simples pertencentes ao grupo dos ácidos (A) hidroxibenzóico e (B) hidroxicinâmico (MORTON *et al.*, 2000)

O ácido gálico, derivado do ácido benzóico é o mais frequentemente encontrado na natureza na forma de seu dímero de condensação, o ácido elágico. O ácido *p*-hidroxibenzóico também é derivado do ácido benzóico, o qual é obtido por hidrólise ácida e possui relação com a lignina. Os ácidos gálico e elágico são constituintes dos taninos hidrolisáveis, os quais são liberados por hidrólise ácida. Os derivados do ácido cinâmico amplamente distribuídos nos vegetais são: ácido *p*-cumárico, cafeíco, ferúlico e ácido sinápico. O *p*-cumárico tem distribuição restrita, mas é importante por originar facilmente, através de ciclização a cumarina, que é um constituinte frequentemente responsável pelo odor característico dos vegetais (SIMÕES *et al.*, 2007).

O ácido clorogênico é frequentemente encontrado em frutas. O ácido cafeíco tanto na forma livre quanto a esterificada é geralmente, o ácido fenólico mais abundante e representa entre 75 e 100% do total de conteúdo dos ácidos hidroxicinâmicos em grande parte das frutas (KIM *et al.*, 2009a).

No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos, destacam-se os ácidos protocatecúico, p-hidroxibenzóico, protocacúico, siríngico, gentísico, salicílico e gálico, já no grupo dos derivados do ácido hidroxicinâmico, constituído por nove átomos de carbono, estão presentes nos vegetais e em todas as partes da fruta, embora sua concentração esteja na parte externa da fruta, encontra-se usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, constituído pelo ácido quínico esterificado ao ácido cafeíco. Assim como podem ser encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres. Dentre os grupos de ácidos, o ácido ferúlico é o mais abundante encontrado em grãos e cereais (SIMÕES *et al.*, 2007; MANACH *et al.*, 2004).

A variedade estrutural desses compostos deve-se a grande variedade de combinações que ocorre na natureza, de modo que são agrupados em diversas classes de acordo com a sua estrutura química básica (tais como o tipo e o número de anéis fenóis), que constitui o anel benzênico e com a sua cadeia constituinte como representados na Tabela 2 a seguir (NUNO, 2012; CAETANO *et al.*, 2009).

Em estudo realizado por Vinson *et al.* (2001), 86% dos compostos fenólicos consumidos diariamente pela população americana provém de oito frutas: banana, maçã, uva, melancia, pêra, melão, pêssego e morango. A principal fonte de ocorrência dos compostos fenólicos em frutas, deriva da polpa, suco ou casca destas, onde foram encontrados no resíduo de acerola: a malvidina 3,5-diglucosídeo, dianidina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-cumárico, quercetina, caempferol (VENDRAMINI & TRUGO, 2004); na polpa da banana: o ácido gálico e catequina (MÉNDEZ *et al.*, 2003); na polpa da laranja: ácido caféico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, narinutina, conjugados de quercetina e de antocianinas (PELLEGRINI *et al.*, 2007). Estudos vêm demonstrando que outros antioxidantes além dos compostos fenólicos tradicionais contribuem para a capacidade antioxidante total das frutas e vegetais (ALMEIDA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2007; KUSKOSKI *et al.*, 2006). Gualberto (2013) tem encontrado na polpa de graviola compostos como ácido gálico, ácido clorogênio, catequina e um composto com espectro semelhante ao p-cumárico.

**Tabela 2:** Classe de compostos fenólicos encontrados em frutas e vegetais.

| Classe                                    | Estrutura               |
|-------------------------------------------|-------------------------|
| Fenólicos simples, bezoquininas           | C6                      |
| Ácidos hidroxibenzóicos                   | C6-C1                   |
| Acetofenol, ácidos fenilacéticos          | C6-C2                   |
| Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides | C6-C3                   |
| Nafitoquinonas                            | C6-C4                   |
| Xantonas                                  | C6-C1-C6                |
| Estibenos, antoquinonas                   | C6-C2-C6                |
| Flavonóides, isovlafonóides               | C6-C3-C6                |
| Lignanas, neolignanas                     | (C6-C3) <sub>n</sub>    |
| Biflavonóides                             | (C6-C3) <sub>2</sub>    |
| Lignanas                                  | (C6-C3) <sub>n</sub>    |
| Taninos condensados                       | (C6-C3-C6) <sub>n</sub> |
| Taninos hidrolisáveis                     | (C6-C1) <sub>n</sub>    |

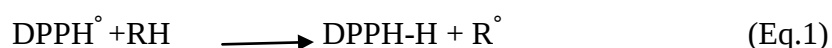
Fonte: Adaptação Vatter *et al.* (2008)

Em virtude da natureza química dos compostos bioativos encontrados nas frutas e vegetais, apresentam-se de inúmeras formas: como agentes redutores, componentes iniciadores da oxidação lipídica, interrompendo a cadeia da reação de oxidação através da doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodynamicamente estáveis ou complexando metais (ARAÚJO *et al.*, 2011). A capacidade antioxidante de compostos fenólicos pode ser determinada através de inúmeros parâmetros, incluindo a remoção de um radical peroxil (ORAC – oxygen radical absorbance capacity, TRAP–total reactive antioxidant potential), a capacidade de redução de metal (FRAP–ferric reducing antioxidant power, CUPRAC – cupric ion reducing antioxidant capacity), a capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS–2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico), DPPH –peroxidação do 2,2-difenil-1-picrylhdrazil) e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS, a oxidação do LDL, co-oxidação do  $\beta$ -caroteno) (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

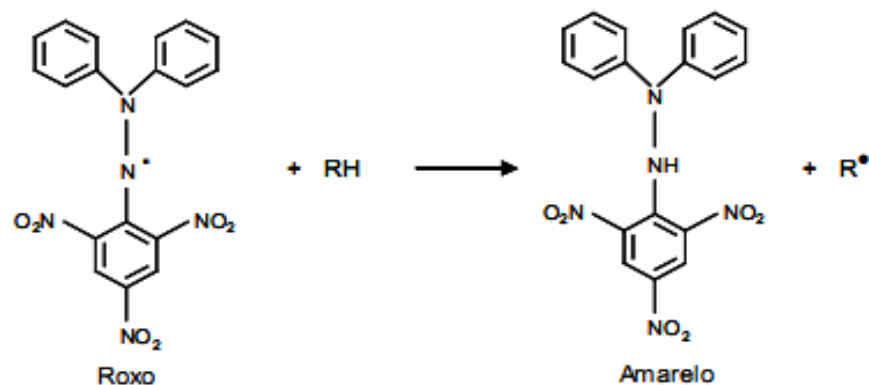
### 3.2. Métodos de avaliação da atividade antioxidante

### 3.2.1. Método do radical DPPH

Foi introduzido como sendo um método fácil e preciso para uso em frutas e extratos vegetais. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, cuja molécula é caracterizada como um radical livre em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, esta peculiaridade confere a esta uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. A redução do radical DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação (Equações 1 e 2). Este ensaio baseia-se na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).



O DPPH é formado diretamente em solução, porém pode ser solubilizado somente em meio orgânico, especialmente em meio alcóolico. É um método que se caracteriza em determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade (SUCUPIRA *et al.*, 2012). O decréscimo da absorbância devido ao aprisionamento do  $\text{DPPH}^\bullet$  por um composto com atividade anti-radical livre resulta na mudança de cor do roxo para o amarelo, conforme a Figura 3. Com o decréscimo da absorbância é possível determinar a porcentagem remanescente de  $\text{DPPH}^\bullet$ , que será proporcional à concentração de antioxidantes. A atividade anti-radical livre será expressa pelo valor  $\text{EC}_{50}$  em porcentagem, bem como esse valor será definido como a quantidade necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).



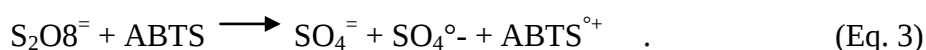
**Figura 3:** Estabilização do radical livre DPPH mostrando a forma radicalar (1) e não radicalar (2) Rufino *et al.* (2007)

A velocidade de reação de um antioxidante com o DPPH° depende da natureza do antioxidante testado, a exemplo o composto ácido ascórbico, o qual reage rapidamente com o DPPH°, a absorvância atinge a estabilidade em menos de 1 min. No entanto, compostos como o  $\delta$ -tocoferol e o guaiacol, estabilizam a absorvância reagem em aproximadamente 30 e 60 min, respectivamente. Diante dessas eventualidades, é evidente que a interação entre o composto antioxidante com o DPPH° depende da estrutura química do composto, principalmente do número de grupo hidroxílicos livres (BRAD-WILLIAMS *et al.*, 1995)

### 3.2.2. Método do radical ABTS<sup>o+</sup>

O método DPPH, cujo radical é gerado sem nenhuma reação química, difere do radical ABTS<sup>o+</sup>, que é obtido por meio de reação química, utilizando-se o dióxido de manganês, o persulfato de potássio e o 2,2'-azobis(2-aminepropane) (ABAP), ou através de uma reação enzimática (peroxidase e mioglobina). Sua vantagem é a possibilidade de medir a atividade de compostos de natureza lipofílica e hidrofílica, enquanto que o DPPH só pode dissolver-se em meio orgânico (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

A reação entre o ABTS e o persulfato de potássio para a formação do radical pode ocorrer conforme a Equação 3, enquanto que na presença de excesso de ABTS, o radical sulfato poderá reagir conforme a Equação 4 (HENRÍQUEZ *et al.*, 2002).

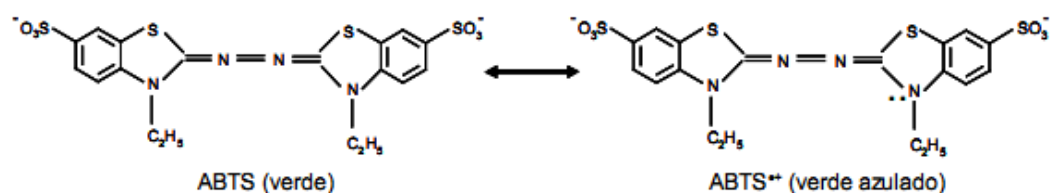




No entanto a reação global que expressa a atividade deste radical encontra-se descrita a seguir:



O radical cromóforo monocatiônico gerado pela oxidação do  $\text{ABTS}^{\circ+}$  com persulfato de potássio, ocorre a abstração do hidrogênio, doador de elétrons, da substância antioxidante pelo radical, promovendo a supressão da cor da solução. Este procedimento de descoloramento é usado para avaliar a atividade antioxidante da amostra. A Figura 4 demonstra a formação do radical  $\text{ABTS}^{\circ+}$ , de cor verde azulado com absorção a 645, 734 e 815 nm, gerado a partir da oxidação do ABTS (RE *et al.*, 199; THOMAS *et al.*, 2004).



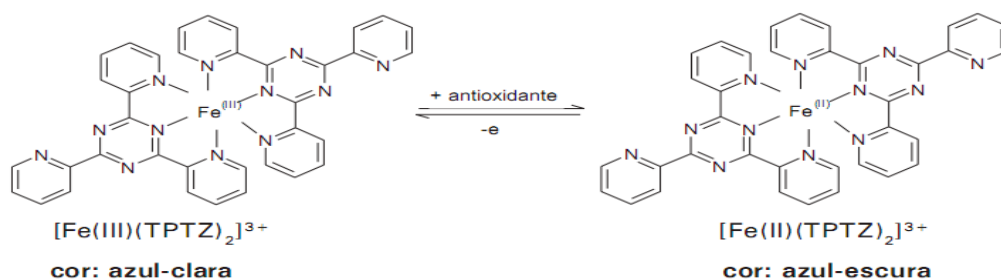
**Figura 4:** Formação do Radical ABTS Rufino *et al.* (2007)

Após a formação do radical, este pode ser reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio perdendo a coloração, assim como será através dessa redução do  $\text{ABTS}^{\circ+}$  que será determinado a concentração do antioxidante, onde os resultados serão expressos por TEAC.

### 3.2.3 Método FRAP

O método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) baseia-se na capacidade de um antioxidante em reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  na presença de 2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina

(TPTZ), onde ocorre a reação com a mudança da coloração do azul claro, para o complexo corado (azul intenso) (Figura 5 ) (PULIDO *et al.* 2000).



**Figura 5:** Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5 triazina) com  $\text{Fe}^{2+}$  Rufino *et al.* (2007)

#### 3.2.4. Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

O método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio) consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda da sua conformidade ao sofrer dano oxidativo, sendo elas a  $\beta$ -ficolretina e a R-ficoeretina (DUXBURY, 2005).

Este ensaio avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio, onde a atividade de uma substância é determinada através da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco, medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo (DAVID *et al.*, 2010). Uma curva de calibração padrão é obtida através de concentrações conhecidas de Trolox gerando a atividade ORAC da amostra. O resultado é expresso em unidade de ORAC ou equivalentes de Trolox, o qual corresponde à quantidade de Trolox em micromols que tem a mesma atividade antioxidante de um litro da solução testada (CAO *et al.*, 1993; DAVID *et al.*, 2010 ).

A determinação de compostos fenólicos, assim como suas características químicas, podem sofrer modificações, de acordo com o método de extração, tipo de solvente empregado na análise, metodologia de ensaio, padrão utilizado, tempo de extração, condições de armazenamento das amostras, entre outros fatores. Segundo Jamal *et al.* (2011), o rendimento da extração destes compostos é dependente do método de extração e da hidrólise ácida que é necessária para libertar os compostos, permitindo assim uma

extração completa, assim como minimizando a oxidação, degradação ou polimerização dos compostos desejados. Para extração desses compostos, vários solventes são empregados, destacando-se as soluções aquosas, metanol, éter, soluções de etanol e acetona, em diferentes concentrações, em que a polaridade dos compostos fenólicos presente em cada amostra, influencia a eficiência de extração (ROCKENBACH *et al.*, 2008). Segundo ANDREO & JORGE (2006), etanol e água são os principais solventes utilizados na extração de antioxidantes.

As metodologias utilizadas para a quantificação destes compostos podem ser divididas em análises espectrofotométricas e análises cromatográficas. A análise espectrofotométrica mais conhecida para a quantificação de compostos fenólicos totais é o método de Folin-Ciocalteu. A metodologia de Folin baseia-se na redução do meio alcalino dos ácidos fosfotungstíco ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), que encontram-se presentes no reagente, a óxido de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e óxido molibidênio ( $Mo_8O_{23}$ ) pelos compostos fenólicos presentes na amostra (BORGES, 2011) (Figura 6). Os óxidos formados apresentam coloração azulada, sendo possível a quantificação da absorbância da solução na região do visível (760nm) e será através de uma curva de calibração expressa em ácido gálico, a qual irá correlacionar a intensidade da cor à concentração de fenóis presentes na amostra, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (EAG) (PEREZ-JIMÉNEZ, 2007).



**Figura 6:** Reação de quantificação de fenólicos totais por reagente de Folin-Ciocalteu

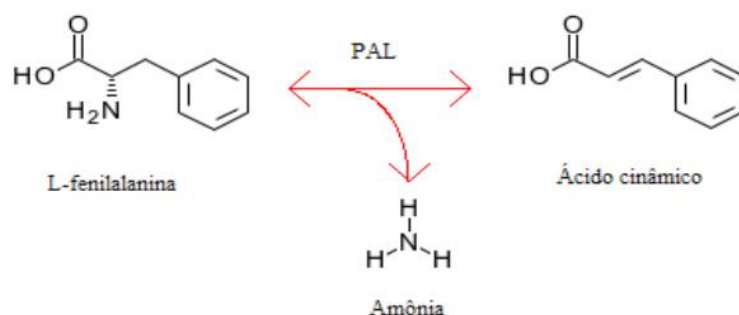
Recentemente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido aprimorada e é a técnica mais utilizada para a identificação e quantificação de compostos fenólicos, bem como para avaliação das interações entre os fenólicos com outros componentes da matriz (NAZCK & SHAHIDI, 2004), embora as separações em gel, papel e camada delgada também sejam utilizadas para identificação desses compostos.

Estas técnicas estão sendo modificadas quer seja na etapa de preparo da amostra ou extração dos compostos, quer seja na fase móvel e ou estacionária, para uma melhor

separação dos compostos, onde a identificação propriamente dita é dificultada devido à grande variabilidade de compostos fenólicos possíveis na natureza, sendo realizada com segurança por espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (CLAE-MS) (NACZK & SHAHIDI, 2004).

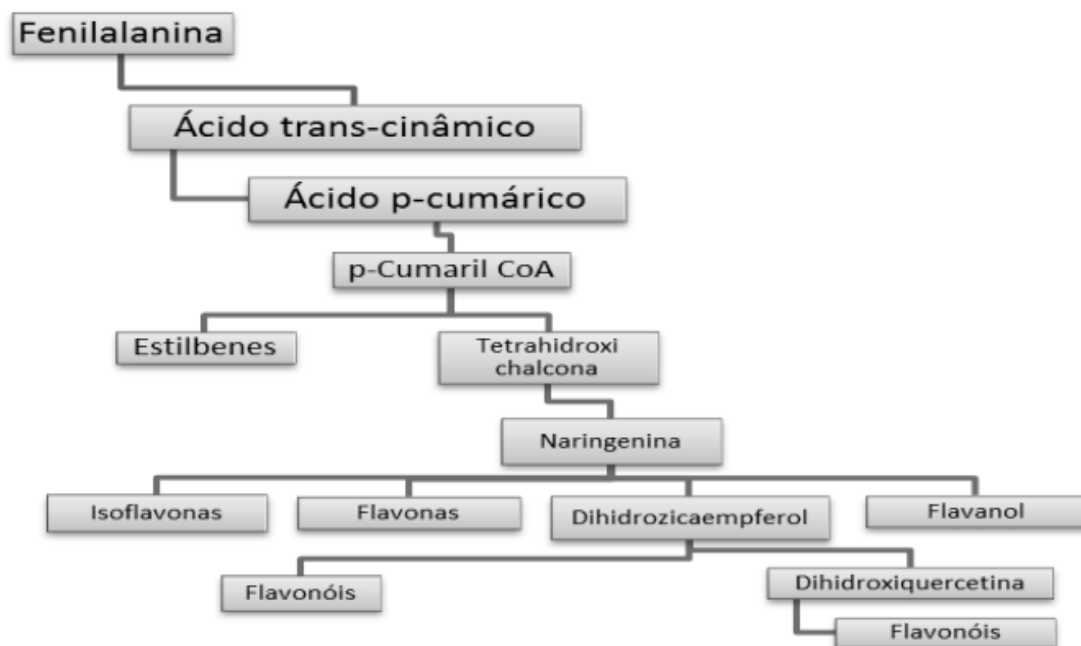
### 3.3. Fontes de obtenção de compostos fenólicos e flavonóides

A biossíntese natural dos compostos fenólicos inicia-se com uma série de reações, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. As duas rotas metabólicas básicas que estão envolvidas na síntese de compostos fenólicos, são a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (VERPORORTE *et al.*, 2007). A Figura 7 demonstra a primeira reação se inicia com a desaminação de L-fenilalanina pela enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL, E.C 4.3.1.24), formando o ácido cinâmico, o qual é hidrolisado formando o ácido cumárico (VERPORORTE *et al.*, 2007).



**Figura 7:** Desaminação da L-fenilalanina pela PAL, formando a ácido cinâmico (VERPOORTE *et al.*, 2007).

A fenilalanina amônia-liase (PAL) é a enzima precursora do ácido cinâmico, constantemente estudada por fisiologistas, devido a sua importância chave no metabolismo secundário de plantas, assim como é a principal enzima que participa do metabolismo fenilpropanóide na maioria dos vegetais e tem sido indicada por seu importante papel no controle de acúmulos fenólicos em resposta às infecções (VERPOORTE *et al.*, 2007).



**Figura 8:** Esquema da biossíntese de compostos antioxidantes a partir do precursor fenilalanina necessário para ocorrer a biossíntese de trans-cinâmico pelos vegetais. Baseado em Verpoorte *et al.* (2007).

O ácido cumárico formado a partir do precursor fenilalanina, possui um grupo carboxil que é ativado com a coenzima A pela cumaril-CoA-ligase para formar o 4-cumaril-CoA. O 4-cumaril-CoA participa das etapas de biossíntese dos compostos flavonóides, tais como isoflavonas, flavonas e estilbenos. Na Figura 8 consta a rota metabólica da biossíntese de compostos antioxidantes a partir do precursor do aminoácido fenilalanina, necessário para ocorrer a biossíntese de ácido transcinâmico pelos organismos vivos e assim ocorrer a biossíntese dos demais compostos flavonóides em isoflavonas, flavonas, catequinas, antocianidinas (VERPOORTE *et al.*, 2007).

Os ácidos ferúlicos e transcinâmicos que fazem parte do grupo dos compostos fenólicos, assim como as quercetinas e canferol, pertencentes aos grupos dos flavonóides são importantes compostos apresentando-se como fitoterápicos utilizados nos tratamentos antivirais, empregados largamente em pesquisas de medicamentos contra infecções (BRUM, 2006).

Os compostos fenólicos estão presentes em todos os vegetais, ou como metabólitos secundários ou biossíntese, na sua forma normal ou em condições de estresse, mas o seu tipo e os níveis variam enormemente dependendo da planta, germinação, estágio de maturação, processamento, condições ambientais e de armazenamento, sua distribuição nos vegetais depende de diversos fatores, de acordo com o filo/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Atualmente vários estudos estão sendo desenvolvidos e comprovados, em especial, que as sementes e cascas de frutas desempenham a função preponderante de possuir altos teores de compostos fenólicos, provavelmente pelo fato das cascas desempenharem a função de defesa e as sementes por assegurarem a propagação das espécies. Diante dessas pesquisas e descobertas, os subprodutos e resíduos agroindustriais apresentam elevado potencial como fonte de fenólicos (ÁJILA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2011; JACQUES *et al.*, 2009; DUEÑAS *et al.*, 2005; SOONG & BARLOW, 2004).

#### 3.4. Resíduos de frutas

Segundo a FAO (2010), o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas com cerca de 39 milhões de toneladas por ano, exportando mais de 1% da sua produção *in natura*, ocupando o 20º lugar entre os países exportadores, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SOUZA *et al.*, 2006). A produção anual de resíduos agroindustriais está estimada em torno de 1,5 bilhões de toneladas, e o Brasil produz cerca de 500 milhões de toneladas de subprodutos e resíduos gerados pelas industriais (SOUZA & SANTOS, 2005). Atualmente os resíduos agroindustriais, principalmente as cascas e sementes de vegetais e frutas, estão sendo reaproveitados na alimentação animal e humana, na tecnologia de elaboração de novos produtos, na produção de enzimas para fins comerciais e lucrativos, ou dispostos no campo, entretanto, grande parte destes ainda são descartados sem tratamentos, causando danos ao meio ambiente (MELO *et al.*, 2011). Uma atenção especial merece destaque, ao teor de compostos com ação antioxidante presente nesses resíduos, pois estudos têm revelado que as cascas e as sementes de frutos, tais como umbu, cajá, manga, carambola, seriguela, acerola exibem atividade antioxidante mais elevada do que a polpa, e que o perfil dos fitoquímicos antioxidantes é diferenciado nestas partes do

fruto (GUO *et al.*, 2003; SOONG & BARLOW, 2004; ÁJILA *et al.*, 2007; MELO & ANDRADE, 2010; ÁJILA *et al.*, 2011; INFANTE *et al.*, 2013).

O aproveitamento de resíduos sólidos provenientes das indústrias processadoras de polpas de frutas tem recebido atenção especial nesses últimos anos, por gerar quantidades apreciáveis de casca, caroço e sementes. Para Senhoras (2005), esses materiais, além de fonte de matéria orgânica, servem como fonte de proteínas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento.

Produtos obtidos a partir do processamento de uvas como os sucos e vinhos são reconhecidos por sua composição química e em especial pela sua capacidade antioxidante. Seus subprodutos estão associados especialmente à composição polifenólica das sementes gerando grande interesse na pesquisa de compostos, também no bagaço, engaço e borra da fermentação. No bagaço de uva, os principais compostos bioativos são ácido gálico, catequina, epicatequina, reverastrol, miricetina, quercetina e kaempferol (BALESTRO *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2011; MONTEALEGRE *et al.*, 2005; MAKRIS *et al.*, 2012).

No processamento de uvas, maçãs, goiaba, acerola, coco verde, os resíduos gerados trazem consigo a relevante propriedade dos compostos fitoquímicos que possuem, proporcionando benefícios à saúde além, de serem resíduos produzidos abundantemente e de baixos custos. A ampla utilização desses resíduos torna este setor uma fonte promissora de substâncias bioativas naturais (SOARES *et al.*, 2008). Sementes de mamão (MACIEL *et al.*, 2010), pendúculo de caju (BROINIZI *et al.*, 2007), cascas de frutos de *Floccoria*, *Uapaca*, *Kirkana* e *Ziziphus nauritina* (NADHALALA *et al.*, 2008), farinha do bagaço de uva (BALESTRO *et al.*, 2011) polpa de Marolo popularmente conhecido como araticum (SOUZA *et al.*, 2012), sementes de melão (MALACRIDA *et al.*, 2007), resíduos de laranja, pêra e manga (MELO, 2008; HUBER *et al.*, 2011) tem sido relatados como fontes naturais de compostos antioxidantes.

Os resíduos agroindustriais têm também apresentado grande potencial para utilização em processos biotecnológicos, como substrato para o crescimento de vários micro-organismos através da fermentação em estado sólido (FES). O uso de resíduos como matriz sólida na FES é vantajoso por possuírem baixo custo, pela possibilidade de produção de produtos de alto valor agregado e por apresentarem em sua composição, matéria orgânica passível de consumo pelos micro-organismos (PELIZER *et al.*, 2007).

O resíduo de acerola apresenta-se como fonte de antioxidante natural e compostos fenólicos, os extratos hidroetanólico e hidrometanólico deste resíduo são superiores ao obtido em extratos de bagaço de uvas (OLIVEIRA *et al.*, 2009; CAETANO *et al.*, 2008a; MEZADRI *et al.*, 2008). Sousa *et al.* (2011) encontraram no resíduo de acerola 881,56 µg/100g de carotenóides, 8,84µg/100g de antocianinas, 1,04µg/g de flavonóides, 89,55 mg/100g de vitamina C e 247,62 mg/100g de fenólicos.

A graviola é uma planta originária da América Central e ao Norte da América do Sul, podendo ser encontrada em toda faixa equatorial do planeta, introduzida no nosso país pelos portugueses no século XVI, os estados da Bahia e São Paulo são os maiores produtores dessa fruta (SOBRINHO, 2010). O resíduo de graviola tem apresentado 21,17 µg/100g de carotenóides,  $8,66 \times 10^{-3}$  µg/100g de antocianina, 1,03 µg/100g de flavonóides e 64,35 mg/100g de vitamina C (SOUSA *et al.*, 2011).

Muitos micro-organismos, tais como *A. niger*, *A. oryzae*; *A. flavus*; *Lactobacilos sp.*, *Micrococcus sp*; são capazes de metabolizar flavonóides modificando suas estruturas através de diferentes reações tais como, hidroxilação, metilação, glicolisação e acetilação ocorrem em todas as classes de flavonóides. As transformações dos flavonóides ocorrem com frequência e podem gerar produtos com maior interesse que seus precursores. Diferentes enzimas (de origem microbiana ou vegetal), ou reações do metabolismo humano, são capazes de transformar os flavonóides utilizando diversos compostos intermediários de sua biossíntese, bem como alguns produtos finais (flavonas, isoflavonas, flavonóides e antocianidinas). Entretanto a biossíntese para a conversão e/ou produção dos compostos antioxidantes a partir de micro-organismos ainda não está completamente definida (AGUIAR *et al.*, 2007).

### 3.5. Obtenção de compostos fenólicos através de fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido pode ser definida como processos onde ocorre o crescimento de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte) (**Figura 9**), cujo conteúdo líquido seja suficiente para assegurar o metabolismo de células e, que não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (SINGHANIA *et al.*, 2009; COUTO & SANROMÁN, 2006; BON *et al.*,

2008). Em geral o substrato utilizado em FES apresenta faixa de umidade entre 30-70%. (GHOSHAL *et al.*, 2012; PANDEY, 2003).



**Figura 9:** Crescimento de *Aspergillus niger* utilizando como suporte sólido casca de maracujá. Disponível em:<<http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/valor20>>

Os substratos tradicionalmente utilizados nesse processo são geralmente produtos agrícolas como arroz, trigo, cevada, polpa de café, polpa de maçã, bagaço de cana, pedúnculo de caju, milho e soja, além dos substratos não convencionais, como resíduos agroindustriais e florestais. Os materiais sólidos utilizados na FES são formados por estruturas complexas que geralmente são pouco acessíveis ao ataque microbiano, devendo possuir partículas de porosidade e tamanho adequado, para facilitar a acessibilidade e a penetração do micro-organismo no substrato, proporcionando um crescimento microbiano na interface sólido/gás e levando a altas taxas de processos bioquímicos (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Segundo Bhianchi *et al.*, (2001), o substrato necessita de um pré-tratamento para se adequar as condições necessárias de crescimento e metabolismo dos micro-organismos: suplementação de nutrientes e correção do pH, para suprir a falta de algum nutriente ou adequar as melhores condições de crescimento microbiano; moagem, quebra, esmagamento e peneiramento objetivando adequar o meio a granulometria mais adequada ao processo; vaporização ou aquecimento, visando a gelatinização ou expansão de substrato; embebedação, para regular o teor de umidade inicial do processo e esterilização, que visa à diminuição ou eliminação de possíveis contaminações.

Os fungos filamentosos são mais utilizados na fermentação em estado sólido, sua forma de crescimento em hifas e boa tolerância à baixa atividade de água e elevada pressão osmótica conferem aos fungos vantagens em relação aos micro-organismos unicelulares para a colonização de substratos sólidos. O fungo *Aspergillus niger* é um micro-organismo muito utilizado em processos fermentativos, apresenta propriedades como facilidade de manipulação e habilidade em fermentar uma grande variedade de matérias primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos. O *Aspergillus niger*, é um micro-organismo capaz de produzir até 19 tipos de enzimas e agrega valor a resíduos agroindustriais pela produção de vários compostos, tais como ácido cítrico, álcoois e outros (GHOSHAL *et al.*, 2012; ORZUA *et al.*, 2009; RODRIGUEZ-COUTO, 2008).

A fermentação em estado sólido apresenta as seguintes vantagens em relação à fermentação submersa: simplicidade nos meios de cultivo, onde o substrato sólido pode requerer apenas adição de água e/ou nutrientes para enriquecimento dos substratos; simplicidade no preparo do meio de cultura; ausência de equipamentos e máquinas sofisticadas; baixo teor de umidade; redução de contaminação durante o processo; economia no consumo de energia; condições de crescimento dos micro-organismos semelhantes às encontradas em seu ambiente natural; alta produtividade e concentração do composto gerado; volume do reator é menor; menor quantidade de água residual é gerada no fim do processo e eliminação da formação de espuma (GHOSHAL *et al.*, 2012; NIGAM, 2009; COUTO & SANRÓMÁN, 2006; SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

Em contrapartida, as limitações desta técnica ainda impedem sua ampla utilização industrial, pois apresenta difícil acessibilidade ao substrato; problemas de transferência de massa, calor e quantidade de movimento devido à baixa condutividade térmica da matéria, tipos de substratos limitados; dificuldade de se controlar os parâmetros como pH, oxigênio dissolvido, quantidade de água e concentração do substrato no estado sólido (GHOSHAL *et al.*, 2012; SINGHANIA *et al.*, 2009; PANDEY, 2003).

A FES, tem sido apontada nos últimos anos como uma estratégia eficiente para o aproveitamento de resíduos agroindustriais para a obtenção de compostos bioativos. Na Tabela 3 estão listados alguns trabalhos onde foram obtidos compostos bioativos a partir da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais.

**Tabela 3:** Pesquisas sobre a obtenção de compostos bioativos por Fermentação em Estado Sólido

| Composto                                                      | Micro-organismo                                                 | Resíduo                                                  | Referência                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fenólicos e antocianinas                                      | <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Rhizopus sp.</i>                  | Feijão preto                                             | Choung <i>et al.</i> (2001)                                                                           |
| Fenólicos totais                                              | <i>Rhizopus oligosporus</i>                                     | Semente de ervilha cozida                                | Starzynska-Janiswska <i>et al.</i> (2008)                                                             |
| Fenólicos totais                                              | <i>Rhizopus oryzae</i>                                          | Farelo de arroz                                          | Ribeiro <i>et al.</i> (2014)                                                                          |
| Fenólicos totais                                              | <i>Rhizopus oligosporus</i>                                     | Abacaxi e goiaba                                         | Souza, (2009)                                                                                         |
| Polifenol; Vanilina                                           | <i>Phanerocheate chysoporum</i>                                 | Bagaço da polpa de maçã, casca de coco verde             | Ájila <i>et al.</i> (2011); Barbosa <i>et al.</i> (2008)                                              |
| Polifenol                                                     | <i>Rhizopus sp</i> ; <i>Aspergillus niger</i>                   | Grãos de feijão                                          | Lee <i>et al.</i> (2008)                                                                              |
| Aumento do teor de fenóis                                     | <i>A. oryzae</i> ; <i>A. awamori</i>                            | Grãos de trigo, pó de Teri pod ( <i>Caesolpina sp</i> )  | Bhanja <i>et al.</i> (2009); Kar <i>et al.</i> (1999)                                                 |
| Ácidos fenólicos e isoflavonóides                             | <i>Trichoderma harzianum</i>                                    | Resíduos de soja                                         | Singh <i>et al.</i> (2010)                                                                            |
| Aumento de fenólicos e da atividade antioxidante              | <i>Cordyceps sinensis</i>                                       | Arroz velho                                              | Kumar <i>et al.</i> (2003); Hernández <i>et al.</i> (2008);                                           |
| Ácidos cítrico e elágicos                                     | <i>Aspergillus niger</i>                                        | Abacaxi, frutas mistas e resíduos maosmi; cascas de romã | Robledo <i>et al.</i> (2008)                                                                          |
| Fenóis                                                        | <i>Rhizopus oligosporus</i>                                     | Feijão verde                                             | Randhir & Shetly (2007)                                                                               |
| Ácido gálico, elágico; tanase e tanino                        | <i>A. niger</i> AA-20; <i>A. niger</i> PSH; <i>A. niger</i> GH1 | <i>Larrea tridenata</i>                                  | Treviño-Cueto <i>et al.</i> (2007); Ventura <i>et al.</i> (2008); Aguilera-Carbo <i>et al.</i> (2009) |
| Ácido elágico                                                 | <i>Lentinus edodes</i>                                          | Bagaço de cranberry (oxicoco)                            | Vattem <i>et al.</i> (2008)                                                                           |
| Ácido gálico, ferúlico, trans-cinâmico, quercetina e canferol | <i>Rhizopus</i> LPB-R.5 E LPB-R.6                               | Mistura de soja, grão e milho e arroz integral,          | Miyaoka (2012)                                                                                        |
| Glicosídeo, monoglicosídeo e galato de franol                 | <i>Bacillus pumilus</i> HY1                                     | Soja integral de CheongGucJang (pasta cozida de soja)    | Cho <i>et al.</i> (2009)                                                                              |

Resíduos de frutas tropicais tais como mangaba, acerola e graviola devido as suas propriedades nutricionais consistem também de uma fonte alternativa para o aproveitamento em processos biotecnológicos visando a obtenção de compostos bioativos. Sergipe é um dos

maiores produtores de mangaba do Nordeste, representando 55,5% da sua produção e comercialização, seguido da Bahia, com 19,7% e a Paraíba, com 13,7% do total produzido no Brasil. Segundo Araújo *et al.* (2011) e Vieira (2007), a composição média das sementes de mangaba secas foi de 4,30% de umidade, 24% de lipídeos, 2,13% de cinzas, pH 5,23, 28,40 de acidez total, 11% de proteína bruta, 25,7% de carboidratos e 33% de fibras. Os resíduos derivados (sementes) deste produto são ricos em nutrientes (SILVA *et al.*, 2012c; GUILHERME *et al.*, 2007). Em processos biotecnológicos, o enriquecimento protéico da farinha das sementes de mangaba tem sido obtido através de fermentação em estado sólido (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Até o momento não há relatos na literatura de utilização de resíduos de graviola, acerola e mangaba para a obtenção de compostos fenólicos através de fermentação em estado sólido. Diante deste fato, este trabalho objetivou avaliar o potencial destes resíduos para a obtenção de compostos fenólicos e/ou flavonóides por FES utilizando o micro-organismo *Aspergillus niger*.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

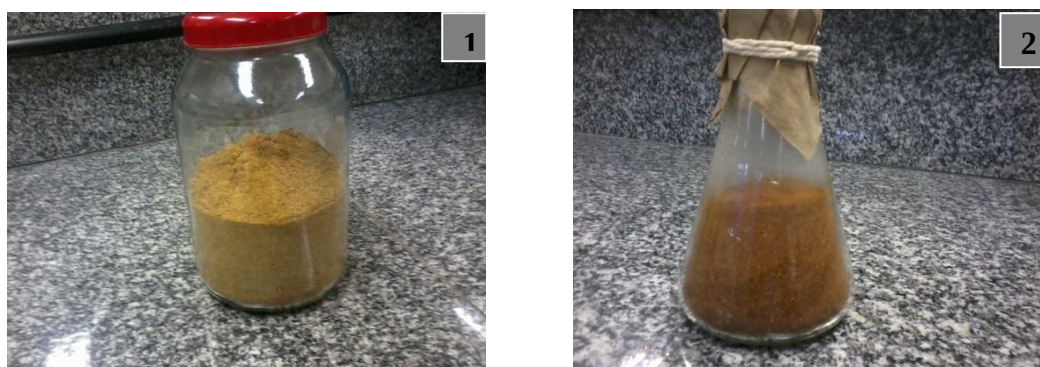
A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA) do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DTA) e as análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Análises e Flavor (LAF) no período de janeiro a dezembro de 2013.

##### 4.1. Obtenção dos resíduos de frutas

Os resíduos do processamento das frutas acerola (*Malpighia glabra*), mangaba (*Harconia speciosa*) e graviola (*Annona muricata*) foram fornecidos por uma indústria de polpas da cidade de Aracaju-SE. Os resíduos de mangaba e graviola foram separados da polpa e utilizados apenas as sementes.

##### 4.2. Tratamento dos resíduos de frutas

O processamento foi iniciado com a separação das sementes, feita manualmente, posteriormente os resíduos foram inicialmente lavados com água corrente, em seguida secados em secador de bandeja (Pardal-PE 100, Brasil) com circulação de ar. Em seguida foram triturados em liquidificador industrial, peneirados, esterilizados por 15 min à temperatura de 121°C e armazenados em recipientes estéreis hermeticamente fechados para posteriores análises. A Figura 10 mostra as farinhas dos resíduos de acerola e graviola, respectivamente.



**Figura 10:** Farinha do resíduo de Acerola (1) e Farinha do resíduo de Graviola (2)

##### 4.3. Micro-organismo

As cepas de *Aspergillus niger* IOC 3677 utilizadas neste trabalho foram adquiridas da coleção de culturas do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). A conservação destas cepas foi realizada em tubos inclinados contendo ágar batata dextrose (PDA), estocados a 4° C, com repiques contínuos a cada três meses, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

#### 4.4. Metodologia Experimental

##### 4.4.1. Caracterização Físico-Química dos Resíduos de Acerola, Graviola e Mangaba

As farinhas dos resíduos de frutas esterilizadas foram caracterizadas quanto à composição físico-química. As análises realizadas foram as seguintes: umidade, proteínas, lipídios, cinzas, acidez e pH. Todas as análises foram realizadas em triplicata, de acordo com metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2005).

##### ✓ pH

O potencial hidrogeniônico ou concentração hidrogênioica das amostras foi realizado a partir da adição de 5g da amostra (sólida) em 50 mL de água. Após a homogeneização e filtração em papel filtro qualitativo, a amostra teve seu pH medido em potenciômetro digital da marca alphakit at-300 (017/IV p.104).

##### ✓ Teor de umidade do resíduo

O teor de umidade se deu mediante método gravimétrico com determinação da perda de peso do produto submetido ao aquecimento a 105 °C, por 2 horas até peso constante. Pesou-se 2g de amostra e transferiu-se para cadinhos previamente identificados, tarados e seco. Onde o cadinho é colocado na estufa, retirado e repesado após 3 horas, até obter peso constante da amostra (012/IV p.98).

##### ✓ Teor de Proteínas

A determinação do conteúdo de proteína foi realizada pela técnica de Kjeldahl, sendo o teor protéico calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,25. Pesou-se 0,5g de amostra, adicionou 2g de mistura catalítica e 1mL de ácido sulfúrico concentrado para digestão, após a digestão, as amostras foram alcalinizadas mediante a solução de hidróxido

de sódio 40% e destiladas. Frascos Erlenmeyer contendo 25mL de ácido bórico receberam a solução destilada, titulada com solução de ácido clorídrico 0,1N (036/IV p.123).

✓ Teor de Lipídios

O teor de lipídios foi realizado por extração com solvente a quente (Soxhlet) utilizando o hexano como solvente de extração durante 8 horas (032/IV p.117).

✓ Teor de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado pelo processo gravimétrico, através da carbonização das amostras, seguida de incineração em mufla de 550°C à 570 °C até massa constante e resfriamento em dessecador (018/IV p.105).

✓ Teor de Acidez

A acidez total consistiu na determinação por meio de titulação com NaOH 0,1N, utilizando-se fenolftaleína (1%, p/v) como indicador. Os resultados foram expressos em g/100g de acidez em ácido oleico (016/IV p.103).

#### 4.4.2. Seleção de solventes para a extração de compostos bioativos dos resíduos de frutas

As extrações de compostos fenólicos e flavonóides das farinhas dos resíduos foram realizadas em triplicata conforme descrito por Bloor (2001) utilizando-se os seguintes solventes: soluções de metanol, etanol, acetona e éter preparadas à 50%, 60%, 70% e 80% (v/v) e água destilada. Os extratos foram filtrados em papel filtro Whatman e o sobrenadante recolhido foi analisado quanto o teor de compostos fenólicos e flavonóides. O solvente selecionado foi aquele que proporcionou maior extração de compostos fenólicos e flavonóides.

#### 4.5. Fermentação do resíduo de fruta para a obtenção de compostos bioativos

O resíduo de fruta que apresentou maior teor de compostos fenólicos e flavonóides totais foi selecionado para os experimentos fermentativos. Com o objetivo de verificar a influência de variáveis, na produção e/ou maximização dos compostos bioativos foi empregado o delineamento composto central rotacional  $2^2$  com 3 repetições no ponto central

e 4 pontos axiais. A produção dos compostos foi avaliada em função da temperatura (X1) e da umidade (X2), conforme a matriz apresentada na Tabela 4. As fermentações foram conduzidas em placas de petri utilizando uma suspensão de esporos de *A. niger* e a cada 5 dias o fermentado foi removido para a extração e quantificação dos compostos fenólicos e flavonóides por espectrofotometria.

**Tabela 4:** Matriz do delineamento composto central rotacional ( $2^2 + 4$  pontos axiais + 3 pontos centrais) empregado no estudo de produção compostos bioativos por FES.

| Experimentos | Níveis Codificados |                | Valores Reais das Variáveis |             |
|--------------|--------------------|----------------|-----------------------------|-------------|
|              | X <sub>1</sub>     | X <sub>2</sub> | Temperatura (°C)            | Umidade (%) |
| 1            | -1                 | -1             | 33                          | 36          |
| 2            | +1                 | -1             | 47                          | 36          |
| 3            | -1                 | +1             | 33                          | 64          |
| 4            | +1                 | +1             | 47                          | 64          |
| 5            | -1,41              | 0              | 30                          | 50          |
| 6            | +1,41              | 0              | 50                          | 50          |
| 7            | 0                  | -1,41          | 40                          | 30          |
| 8            | 0                  | +1,41          | 40                          | 70          |
| 9            | 0                  | 0              | 40                          | 50          |
| 10           | 0                  | 0              | 40                          | 50          |
| 11           | 0                  | 0              | 40                          | 50          |

X<sub>1</sub>: Valores codificados para temperatura (°C); X<sub>2</sub>: Valores codificados para umidade (%).

#### 4.6. Quantificação de compostos fenólicos e flavonóides por espectrofotometria

##### 4.6.1. Quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) pelo Método de Folin-Ciocalteu

A quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos dos resíduos e dos fermentados foi realizado pelo método de Folin-Ciocalteu conforme metodologia descrita por Thaipong (2006), com algumas modificações. Alíquotas dos extratos foram transferidas para tubos de ensaio e adicionou-se solução do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma) 1N e solução de carbonato de sódio 10% (p/v). Em seguida homogeneizou-se as soluções em vórtex, e os tubos de ensaio foram deixados em local escuro por 30 min. Após este tempo, as amostras foram analisadas por espectrofotometria à 765 nm (marca Spectrum e modelo UV-VIS-espectrofotometer). O branco utilizado foi com os mesmos reagentes, substituindo os extratos por água destilada. Uma curva de calibração foi obtida a partir de diferentes concentrações de ácido gálico conforme mostrado no Anexo I. Os resultados foram convertidos e expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/100g substrato.

#### 4.6.2. Quantificação de Flavonóides Totais (FT)

A quantificação de flavonóides totais nos extratos dos resíduos e nos fermentados foi realizada segundo metodologia descrita por Dewanto *et al.* (2002), com algumas modificações. Alíquotas de extrato foram colocadas em tubos de ensaio e adicionou-se de cloreto de alumínio 2% (p/v), em seguida homogeneizou-se em vórtex e deixou-se em repouso no escuro por 30 min. As absorbâncias das amostras foram lidas à 415 nm. A concentração total de flavonóides totais foi determinada através da curva de calibração de catequina conforme mostrado no Anexo I. Os resultados foram convertidos e expressos em mg de flavonóides totais/100mg de amostra.

#### 4.7. Determinação da Atividade Antioxidante (AA)

Os experimentos para determinar a atividade antioxidante foram realizados nos resíduos de graviola e para os extratos fermentados que obtiveram maior quantidade de compostos fenólicos e flavonóides totais.

Para a extração dos compostos antioxidantes utilizou-se a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007). Inicialmente pesou-se a amostra (farinha do resíduo ou fermentado), adicionou-se metanol, sonicou-se por 30 min (Utrassom-Marca ECTL-ALPHA 3L Plus) e filtrou-se em papel de filtro. Ao resíduo resultante da filtração adicionou-se acetona, sonicou-se por mais 30 min e filtrou-se. Os 2 filtrados obtidos foram misturados e secados em evaporador rotativo para a concentração da amostra. Em seguida, a amostra foi ressuspendida em 7 mL metanol puro (grau HPLC), obtendo-se os extratos para as análises antioxidantes.

##### 4.7.1. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de DPPH

O procedimento foi determinado usando a solução de DPPH com alto grau de pureza seguindo a metodologia de Rufino *et al.* (2007). Para preparar a solução do radical DPPH foram dissolvidos DPPH em metanol PA (Sigma). A partir dos extratos obtidos no item anterior, preparou-se em tubos de ensaio três diluições em triplicata. Em seguida transferiu-se uma alíquota de cada diluição para tubos de ensaio contendo radical DPPH, homogeneizando em vórtex, deixou-se em repouso por 30 min à temperatura ambiente. As absorbâncias das amostras foram lidas à 515 nm. Para o controle (branco) utilizou-se o metanol em substituição à amostra.

Foi construída uma curva de calibração utilizando diferentes concentrações de DPPH (Anexo I). Após a obtenção da curva, encontrou-se o consumo em  $\mu\text{M}$  de DPPH, em seguida, transformou-se para g DPPH. A capacidade antioxidante foi calculada, e o resultado foi correspondente à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH ( $\text{EC}_{50}$ ). A capacidade antioxidante foi expressa em g por fruta/g DPPH, de acordo com a Equação 6, a seguir:

$$\text{g fruta/g DPPH} = (\text{EC}_{50} \text{ (mg/L)} \cdot 1.000.1) / \text{g DPPH} \quad \text{Equação 6}$$

#### 4.7.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de $\text{ABTS}^{\circ+}$

A atividade antioxidante pelo método  $\text{ABTS}^{\circ+}$  foi feita conforme metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007). O radical foi formado a partir da reação da solução do  $\text{ABTS}^{\circ+}$  com solução de persulfato de potássio, incubado a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , por 16 h em ambiente escuro.

Após este tempo, a mistura foi diluída em álcool etílico até obter absorvância de  $0,700 \pm 0,200$  à  $734 \text{ nm}$  à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .

Em ambiente escuro, 3,0 mL da solução de radical  $\text{ABTS}^{\circ+}$  foi acrescentado cada extrato diluído. O etanol foi usado como branco em substituição aos extratos.

A atividade antioxidante foi determinada como % de inibição do ABTS em função da concentração dos extratos, usando como referência uma curva de calibração elaborada com diferentes concentrações de trolox (Sigma) (Anexo I).

Para calcular a AAT, foi substituído na equação da reta a absorvância equivalente a  $1.000 \mu\text{L}$  do padrão de Trolox e os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  trolox/g de resíduo vegetal em base úmida (NENADIS *et al.*, 2004).

#### 4.7.3. Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) foi realizada segundo Rufino *et al.* (2007).

Em ambiente escuro transferiu-se uma alíquota de cada extrato diluído para tubos de ensaio, em seguida acrescentou-se e água destilada e o reagente FRAP, homogeneizou-se em vórtex mantendo-se em banha-maria a 37°C durante 30 min. Após este tempo fez-se a leitura da absorbância à 595nm. O reagente FRAP foi utilizado como branco. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em  $\mu\text{M}$  sulfato ferroso/g de resíduo vegetal base úmida (equivalente ao sulfato ferroso heptahidratado). Todas as análises foram realizadas em triplicata e a curva de calibração utilizada está apresentada no Anexo I.

#### 4.8. Identificação e Quantificação de compostos bioativos por HPLC

##### 4.8.1. Extração de compostos bioativos

A extração dos compostos dos fermentados foi realizada segundo metodologia descrita por CHUNG *et al.* (2011). Para os fermentados e o resíduo de graviola adicionou-se acetonitrila (grau HPLC) e ácido clorídrico 0,1 N, em seguida, agitou-se à temperatura ambiente por 2 h. O extrato bruto foi filtrado através de papel filtro Whatman (Nº 41) e o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador (Evaporador Rotativo Quimis Modelo Q-344B2) sob vácuo à 40°C em banho maria. A amostra concentrada foi ressuspensa em metanol aquoso (80%) (HPLC) e filtrado em filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Os sobrenadantes obtidos foram armazenados à -18°C, para a realização das análises de atividade antioxidante (conforme o item 4.6) e em HPLC.

##### 4.8.2. Análise dos compostos bioativos através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O sistema HPLC utilizado foi Shimadzu, modelo Ultimate 3000 HPLC-DAD, equipado com uma bomba Ultimate 3000, compartimento amostrador em coluna Ultimate e um detector de arranjo de diodo Ultimate 3000, e software Chromeleon para identificar e quantificar os compostos antioxidantes. Foi utilizada para separar os compostos a coluna de fase reversa Shimadzu Shimparck VP-ODS, C18 (250 mm x 4,6 mm com partícula de 0,5  $\mu\text{m}$ ). A coluna foi mantida à 40°C durante as análises e a detecção foi realizada em três comprimentos de onda, com áreas de pico em 254, 310 e 370 nm. O volume de injeção de amostra foi de 20  $\mu\text{L}$ , com fluxo de 1,0 mL/min.

Este método foi baseado na metodologia de Chung *et al.* (2011), em que fase móvel A consistiu de 0,1% de ácido acético glacial em água mili-Q e a fase móvel B consistiu de

acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido acético glacial. Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC (JT Baker, EUA).

#### 4.8.3. Identificação e quantificação dos compostos bioativos

Inicialmente foram injetados os compostos padrões: ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido protocatecuico, catequina, quercetina, ácido protocacuico, ácido ferúlico, epicatequina, ácido cafeíco e ácido clorogênico. A identificação dos compostos bioativos presentes nos extratos foi realizada pela comparação de espectros de absorção e do tempo de retenção dos padrões nas mesmas condições analíticas. Para a quantificação foram construídas curvas padrão dos referidos compostos (ANEXO II).

Todos os padrões foram preparados em metanol absoluto e as curvas de calibração foram obtidas a partir das seguintes concentrações: Ácido gálico e ácido ferúlico: 0,28-0,0005 mg/mL; ácido protocacuico: 1,0- 0,0001 mg/mL e ácido p-cumárico: 1,0-0,0019 mg/mL.

#### 4.9. Análise estatística

Todas as medições foram realizadas em triplicatas. A análise dos resultados do planejamento experimental foi realizada pelo programa Estatistic 8.0. Os resultados obtidos nas análises físico-químicas e compostos fenólicos e flavonóides totais foram analisados pelo teste de Tukey. As diferenças de  $p < 0,05$  serão consideradas estatisticamente significativas, sendo os resultados apresentados como valores médios  $\pm$  DP (desvio padrão).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização físico-química das farinhas dos resíduos

A biossíntese e produção dos compostos bioativos em processos fermentativos podem ser induzidas pela presença de nutrientes no substrato, os quais são metabolizados por enzimas produzidos pelos micro-organismos durante o processo (BARRIOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2005). Diante disto, é de suma importância a caracterização dos resíduos

agroindustriais utilizados como substratos nos processos fermentativos. Neste trabalho, os resíduos das farinhas de acerola, graviola e mangaba esterilizados foram caracterizados quanto às análises físico-químicas, concentração de fenólicos totais (CFT) e flavonóides totais (FT), os resultados estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Caracterização físico-química das farinhas dos resíduos de frutas

| Parâmetros                             | Resíduos      |               |             |
|----------------------------------------|---------------|---------------|-------------|
|                                        | Acerola       | Graviola      | Mangaba     |
| pH                                     | 3,70±0,06     | 5,00 ±0,20    | 4,02±0,02   |
| Umidade (%)                            | 8,46±0,86     | 5,9±0,32      | 4,08±0,45   |
| Proteína (%)                           | 6,86±0,10     | 10,78±1,11    | 10,25±0,16  |
| Lipídeos (%)                           | 8,45±0,86     | 29,9±0,34     | 24,5±0,15   |
| Carboidratos (%)                       | 75,12±0,45    | 52,43±0,58    | 58,27±0,43  |
| Cinzas (%)                             | 0,97±0,00     | 0,98±0,00     | 2,9±0,24    |
| Acidez (%)                             | 35,3±0,0      | 8,9±1,23      | 11,05±1,2   |
| Fenólicos totais<br>(mg EAG/100g seca) | 2251,7 ± 0,03 | 12571± 0,02   | 90,89 ± 0,1 |
| Flavonóides totais (mg/g seca)         | ± 0,13        | 697,88 ± 0,13 | 128,0 ±0,05 |

Os valores referem-se à média ± desvio padrão de três determinações

Foi observado que o pH dos resíduos variou entre 3,0 e 5,0 sendo o resíduo da acerola o mais ácido dentre os três. O pH é um parâmetro importante na fermentação em estado sólido pois cada micro-organismo apresenta valores ótimos de pH para seu crescimento. Similar a este trabalho, Silva *et al.* (2012b) obtiveram valores de pH 4,0, 3,23 e 4,43 para os resíduos de mangaba, acerola e graviola, respectivamente. Tendo em vista que os fungos se desenvolvem em pHs ácidos (4,5-5,0) (JAY, 2005), o pH dos resíduos não foi alterado para os experimentos fermentativos. Abud & Narain (2009) caracterizando farinha de acerola desidratada obtiveram pH 3,87, demonstrando assim uma similaridade ao resíduo da acerola cujo pH foi 3,70.

O resíduo de acerola apresentou maior teor de umidade (8,46%) do que os resíduos de graviola (5,90%) e mangaba (4,08%) e Souza & Aquino (2012), Vieira (2007) e Leal (2012) têm obtido para os resíduos de mangaba 6,0%, 3,03% e 6,03% de umidade,

respectivamente. Leal (2012) obteve teores de umidade para os resíduos de graviola e acerola, e o de mangaba de 6,77% e 8,97%, respectivamente. Essas diferenças nos teores de umidade podem ser devido ao tratamento térmico realizado no processo de obtenção das farinhas.

Neste trabalho, a umidade foi determinada após a secagem em estufa de circulação de ar e esterilização, e está vinculada às características peculiares de cada resíduo. O preparo do substrato para o processo fermentativo deve levar em conta os níveis de atividade de água e umidades ideais, nesse processo a adição de água ou solução de nutrientes enriquecedora ao meio deve ser de forma a alcançar os níveis ideais, que são conseguidos em torno de 30-70% de umidade, para o desenvolvimento do micro-organismo selecionado para o cultivo (GHOSHAL *et al.*, 2012; PANDEY, 2003).

O resíduo de graviola demonstrou maior teor de proteínas (10,78%) do que os resíduos de acerola (6,86%) e mangaba (10,25%). Em relação ao teor de gorduras o resíduo de graviola apresentou o maior valor de 29,9%, em relação aos resíduos de mangaba e acerola (8,45%). Silva *et al.* (2012b) ao caracterizar resíduos do processamento de acerola, graviola e mangaba, encontraram teores de lipídeos de 1,26%, 5,35% e 8,1% respectivamente, bem menores aos encontrados neste trabalho. Valores semelhantes foram obtidos por Leal (2012) sendo o teor de proteínas no resíduo de acerola e graviola de 6,86% e 10,78%, respectivamente. Já o resíduo de mangaba apresentou um teor de proteína inferior ao reportado no trabalho. Araújo *et al.* (2010) obtiveram para a farinha de sementes da mangaba teor de lipídeos 23,50%, similar a este trabalho e maior teor de proteínas de 15,0%. Essas diferenças podem ser devido a variedades do fruto, clima, época de colheita e estado de maturação. Em relação à graviola apesar de possuir alto potencial para a exploração econômica, existem ainda poucos estudos relatados na literatura com essa fruta.

Sousa *et al.* (2011) obtiveram para o resíduo de acerola 0,55% de cinzas, 10,76% de carboidratos totais, 3,59% de lipídeos, 1,65% de proteína e 0,48% de cinzas, 1,09% de proteínas, 12,99 % de carboidratos totais, 2,28% de lipídeos na polpa de graviola. Os teores de umidade, proteína, lipídeos e cinzas diferem dos encontrados por Sousa *et al.* (2011), fato esse que pode ser justificado, devido às condições adversas de cada cultivar, processamento e variedade das frutas.

A determinação dos fenólicos totais mostrou que os resíduos apresentaram quantidades variáveis destes compostos, tendo o resíduo de acerola apresentado os maiores

valores (2251,718 mg EAG/g) e em segundo lugar o resíduo de graviola (1257 mg EAG/g de resíduo). Sousa *et al.* (2011) obtiveram para os resíduos da polpa de acerola e graviola 247,62 mg/100 g de fenólicos totais e 18,60 mg/100g, respectivamente. Estes valores foram inferiores aos obtidos neste trabalho, isso provavelmente possa ter ocorrido, porque as amostras passaram por processos de extração distintos, além de serem espécies e cultivares diferentes, o que contribui para essa diferença de valores de compostos.

Os resultados da composição mostram que os resíduos são fontes de nutrientes ainda bioutilizáveis. As diversas fontes de nutrientes presentes (gordura, proteínas) além de minerais, nitrogênio e fibras podem ser metabolizadas por microorganismos, gerando compostos de interesse através da FES (SOUSA, 2002).

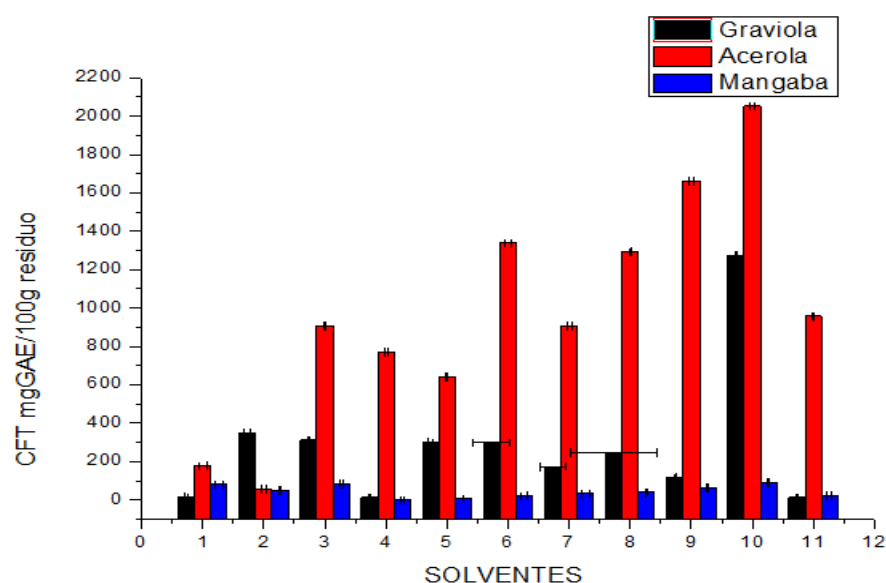
## 5.2. Influência dos solventes na extração dos compostos bioativos nos resíduos de frutas

Considerando que nas frutas há polifenóis com polaridade diversificada, recomenda-se o uso de solventes com diferentes polaridades de modo a possibilitar a extração eficiente destes constituintes (ÁJILA *et al.*, 2011). Os conteúdos de compostos fenólicos e flavonóides totais obtidos nos diferentes extratos dos resíduos de frutas estão demonstrados na Tabela 6 e Figuras 11 e 12.

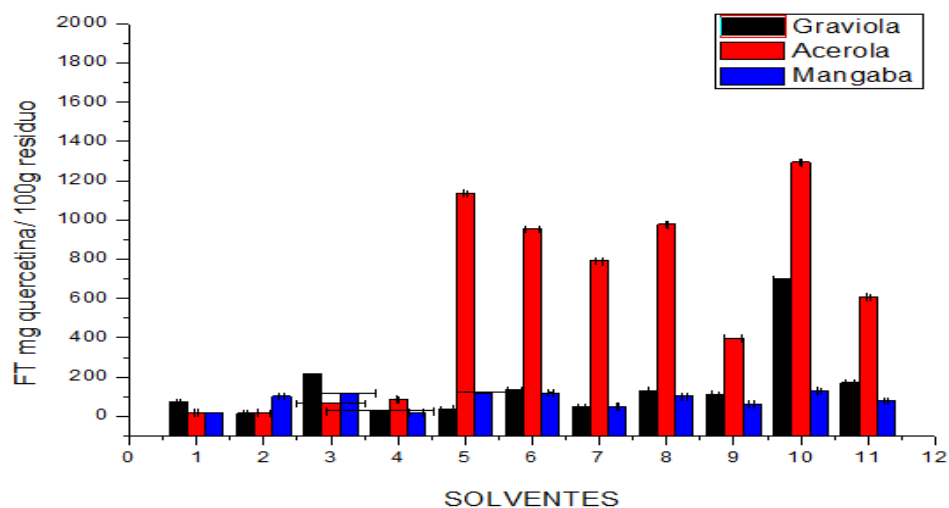
**Tabela 6:** Teor de compostos fenólicos e flavonóides totais equivalentes ao ácido gálico e quercetina nos extratos das farinhas dos resíduos de graviola, acerola e mangaba (mg EAG/g seco de resíduo e mg de quercetina /g seco de resíduo)

| Solventes   | Fenólicos Totais (mg EAG/g de resíduo) |                                |                              | Flavonóides Totais (mg/g de resíduo) |                             |                             |
|-------------|----------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|             | Graviola <sup>a</sup>                  | Acerola <sup>a</sup>           | Mangaba <sup>b</sup>         | Graviola <sup>c</sup>                | Acerola <sup>b</sup>        | Mangaba <sup>a*</sup>       |
| Etanol 80%  | 311,33 ± 0,02 <sup>abA</sup>           | 906,54 ± 0,01 <sup>abcB</sup>  | 83,37 ± 0,03 <sup>abC</sup>  | 215,17 ± 0,08 <sup>bEF</sup>         | 64,57 ± 0,05 <sup>bB</sup>  | 119,04±0,04 <sup>aAB</sup>  |
| Etanol 60%  | 351,41 ± 0,05 <sup>Aa</sup>            | 55,63 ± 0,05 <sup>aB</sup>     | 51,98±0,01 <sup>cdC</sup>    | 14,64± 0,02 <sup>bCDEF</sup>         | 17,42±0,01 <sup>cC</sup>    | 103,78±0,04 <sup>aAB</sup>  |
| Etanol PA   | 14,22 ± 0,02 <sup>Fc</sup>             | 179,13 ± 0,06 <sup>eB</sup>    | 82,19 ± 0,07 <sup>abA</sup>  | 70,72 ± 0,02 <sup>aF</sup>           | 18,89 ± 0,02 <sup>aC</sup>  | 18,89±0,03 <sup>aD*</sup>   |
| Metanol 50% | 14,66 ± 0,01 <sup>fB</sup>             | 771,91 ± 0,03 <sup>cdA</sup>   | 0,62 ± 0,02 <sup>gB</sup>    | 28,10±0,01 <sup>bEF</sup>            | 85,53± 0,03 <sup>aB</sup>   | 19,04 ± 0,02 <sup>bD</sup>  |
| Metanol 60% | 298,65 ± 0,0 <sup>Ba</sup>             | 642,44 ± 0,01 <sup>cdB</sup>   | 5,19 ± 0,01 <sup>fgC</sup>   | 35,03 ± 0,01 <sup>cBCD</sup>         | 1134,10± 0,05 <sup>aA</sup> | 119,77±0,04 <sup>bAB</sup>  |
| Metanol 80% | 298,36 ± 0,03 <sup>Ba</sup>            | 1341,63 ± 0,05 <sup>aB</sup>   | 20,74 ± 0,06 <sup>efgC</sup> | 133,56 ± 0,05 <sup>aA</sup>          | 954,43 ± 0,05 <sup>aA</sup> | 119,67±0,04 <sup>aAB</sup>  |
| Acetona 50% | 174,71 ± 0,02 <sup>dA</sup>            | 906,54±0,04 <sup>cdA</sup>     | 32,16 ± 0,06 <sup>deB</sup>  | 47,19 ± 0,01 <sup>bCDE</sup>         | 791,74±0,02 <sup>aA</sup>   | 48,68±0,01 <sup>bCD</sup>   |
| Acetona 60% | 247,81 ± 0,07 <sup>Ca</sup>            | 1292,11 ± 0,01 <sup>abA</sup>  | 40,49 ± 0,01 <sup>cdB</sup>  | 131,07 ± 0,05 <sup>aAB</sup>         | 977,49±0,09 <sup>Aa</sup>   | 101,74± 0,04 <sup>bAB</sup> |
| Acetona 70% | 117,67 ± 0,0 <sup>eB</sup>             | 1662,46 ± 0,03 <sup>cdA</sup>  | 64,36 ± 0,01 <sup>bcB</sup>  | 110,76 ± 0,04 <sup>cCDEF</sup>       | 397,45±0,13 <sup>aA</sup>   | 60,03±0,05 <sup>bA</sup>    |
| Acetona 80% | 1257 ± 0,02 <sup>cA</sup>              | 2051,79 ± 0,03 <sup>bcdA</sup> | 90,89± 0,01 <sup>aB</sup>    | 697,88 ± 0,13 <sup>cDEF</sup>        | 1294,31±0,01 <sup>aA</sup>  | 128,19±0,03 <sup>bBC</sup>  |
| Água        | 14,22 ± 0,01 <sup>Fc</sup>             | 957,57 ± 0,01 <sup>dA</sup>    | 22,88± 0,04 <sup>efB</sup>   | 171,81 ± 0,06 <sup>bABC</sup>        | 606 ± 0,03 <sup>aA</sup>    | 78,74±0,02 <sup>cCD</sup>   |

\* Valores das médias das triplicatas±desvio padrão/ Médias seguidas de letras minúsculas refere-se às colunas e letras maiúsculas refere-se às linhas; as médias seguidas de letra distintas diferem significativamente entre si (p<0,01) pelo teste de Tukey.



**Figura 11:** Concentração de fenólicos totais nos extratos das farinhas de graviola, acerola e mangaba utilizando os seguintes solventes: 1= Etanol PA; 2=Etanol 60%; 3=Etanol 80%; 4=Metanol 50%; 5=Metanol 60%; 6=Metanol 80%;7=Acetona 50%; 8=Acetona 60%; 9=Acetona 70%; 10=Acetona 80% e 11=Água



**Figura 12:** Concentração de flavonóides totais nos extratos das farinhas de graviola, acerola e mangaba utilizando os seguintes solventes: 1= Etanol PA; 2=Etanol 60%; 3=Etanol 80%; 4=Metanol 50%; 5=Metanol 60%; 6=Metanol 80%;7=Acetona 50%; 8=Acetona 60%; 9=Acetona 70%; 10=Acetona 80% e 11=Água

As soluções aquosas, metanólicas, etanólicas e com acetona apresentaram diferença estatística entre si ao nível de 1% de significância ( $p < 0,01$ ), para todos os resíduos. Os resultados demonstram que maior teor de compostos fenólicos totais e flavonóides totais foi obtido nas farinhas dos resíduos de acerola, graviola e mangaba quando realizada a extração com acetona a 80%. O conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos são significativamente dependentes dos solventes aplicados na extração (KUSKOSKI *et al.*, 2005). Além disso, segundo Ferreira *et al.* (2012), a mistura acetona:água é mais apropriada para maximizar a extração de polifenóis, a acetona tende a bloquear a interação tanino-proteína, promovendo uma maior extração de compostos.

A farinha de acerola foi a que apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais (2051,79 mg EAG/100g) e flavonóides totais (1294,31 mg/g) quando comparado aos valores obtidos nos demais resíduos. Os menores valores de fenólicos totais na farinha de graviola foram com os solventes etanol absoluto em 14,22 mg EAG/g e água 14,22 mg EAG/g de resíduo. No resíduo de acerola o menor teor extraído foi 55,63 mg EAG/g de resíduo de fruta, cujo solvente extrator foi etanol absoluto e a farinha da semente da mangaba, obteve as menores concentrações em 91% das soluções extratoras. Os teores de fenólicos e flavonóides dos resíduos de frutas ao serem comparados entre si, de acordo com os solventes de extração, diferiram significativamente entre eles ( $p < 0,01$ ).

A eficiência da acetona, na extração de fenólicos totais, foi constatada também por Xu & Chang (2007) onde maior quantidade destes compostos foi extraído em lentilhas, soja e duas variedades de feijão com acetona a 80%; Perchel *et al.* (2006), os quais obtiveram maior extração de fenólicos em alcachofra, tomate e brócolis com acetona a 80% e Jamal *et al.* (2011), os quais verificaram que maior teor de compostos fenólicos em bagaço de maçã foi obtido com acetona a 80%.

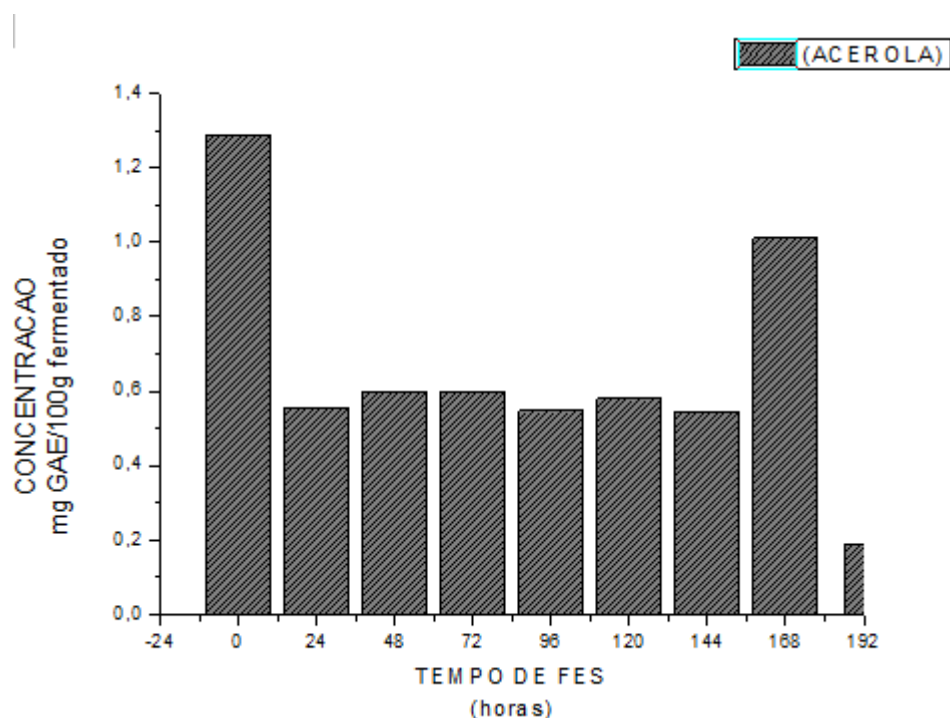
A prioridade de escolha de determinado solvente não pode ser analisada apenas por suas características macroscópicas, tais como constantes físicas como densidade, constante dielétrica, índice de refração, assim como também devem ser consideradas as características descontínuas que consistem nas interações entre moléculas de solventes (SILVA & JONES JR, 2001). Solubilidade é importante propriedade físico-química na determinação da forma farmacêutica e cosmética adequada dos fitoquímicos antioxidantes, uma vez que quanto maior a constante dielétrica, maior a capacidade de solvatar cargas opostas em dois compostos. Solventes, como metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etila

dimetilformamida e suas combinações são usados em combinação ou não com várias proporções de água para extração de compostos fenólicos (NACKZ & SHAHIDI, 2006). Embora o uso de solventes orgânicos na elaboração de extratos de resíduos de frutas e vegetais seja convencional, seu emprego implica em questões relativas à toxicidade ambiental e farmacológica, além da periculosidade existente ao manipulá-los (SILVA & JONES JR, 2001). Assim, a substituição dos solventes orgânicos tradicionais por água ou misturas com água, é de grande interesse pelo menor impacto ambiental, custo operacional, periculosidade e toxicidade.

Diante dos resultados apresentados a acetona a 80% foi utilizada como solvente para a extração de compostos fenólicos e flavonóides totais nos fermentados. Tendo o resíduo de acerola apresentado maiores teores de compostos bioativos, este foi selecionado para a realização dos experimentos fermentativos.

### 5.3. Potencial dos resíduos de frutas para a obtenção de compostos bioativos por fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido foi realizada inicialmente com o resíduo de acerola e o micro-organismo *Aspergillus niger*, entretanto conforme observado na Figura 13, ao longo do tempo de fermentação o teor de compostos fenólicos totais diminuiu. Este resultado pode ter ocorrido devido a algumas hipóteses tais como: pH ácido do resíduo de acerola, o qual inibiu o crescimento microbiano ou a degradação dos compostos devido a produção de enzimas indesejáveis. Diante disto, este resíduo foi descartado e o resíduo de graviola por ter apresentado maiores teores de proteínas e lipídeos, compostos fenólicos e flavonóides totais do que os obtidos no resíduo de mangaba, foi selecionado para a realização dos experimentos fermentativos.



**Figura 13:** Concentração de compostos fenólicos totais nos fermentados de acerola durante 192 horas de fermentação utilizando *Aspergillus niger*.

A Tabela 7 e as Figuras 14 e 15 mostram as concentrações de fenólicos e flavonóides totais obtidas em cada experimento. A máxima quantidade de compostos fenólicos totais foi obtida em 120h de fermentação nos fermentados 2, 3, 5, 7, 8 e 9 sendo de 1529; 1332,3; 1786,9; 2169,5; 1460,8; e 1366,1 mg EAG/100g seco de resíduo, respectivamente. Após este tempo, houve diminuição dos compostos com o tempo em todos os demais experimentos, como visualizado pelas Figuras 14 e 15. Este fato pode ter ocorrido provavelmente pela oxidação de compostos fenólicos, por meio de biossíntese dos ácidos durante o processo de fermentação (KIM *et al.*, 2013). Tal comportamento também foi observado por Cho *et al.* (2009), os quais obtiveram aumento nos teores de ácido gálico e flavonóides e diminuição nas quantidades de isoflavonas glicolisadas, malonilglicosídeos e galatos flavanol em grãos de soja após a FES utilizando *Bacillus pumilus*.

Em comparação ao valor de compostos fenólicos totais obtidos no resíduo de graviola não fermentado (tempo 0) onde a concentração foi de 1257 mg EAG/100g de fenólicos totais, verificou-se que a FES do resíduo proporcionou um aumento destes

compostos nos experimentos 2, 3, 5, 7 e 9 em 120h de fermentação e no experimento 8 com 240h de fermentação. A maior produção foi obtida quando utilizado 30% de umidade de resíduo e temperatura de 40°C (experimento 7).

Ájila *et al.* (2011) também verificaram aumento no teor de compostos fenólicos após a fermentação de bagaço de maçã, com *Phanerochaete chrysosporium* de 4,6 para 16,12 mg EAG/g seco de fermentado, usando a extração com acetona a 80%. Ribeiro *et al.* (2013) obtiveram aumento de compostos fenólicos em farelo de arroz, fermentado por *Rhizopus oryzae* de cerca de 74% após 24 h de fermentação. Barbosa *et al.* (2008) têm observado que na FES com casca de coco utilizando *Phanerochaete chrysosporium*, a produção de enzimas lignolíticas pelo micro-organismo ocasionou a liberação de ácidos ferúlicos presentes na parede da casca do resíduo, obtendo-se em seguida a vanilina, aumentando o teor destes compostos no resíduo após o processo.

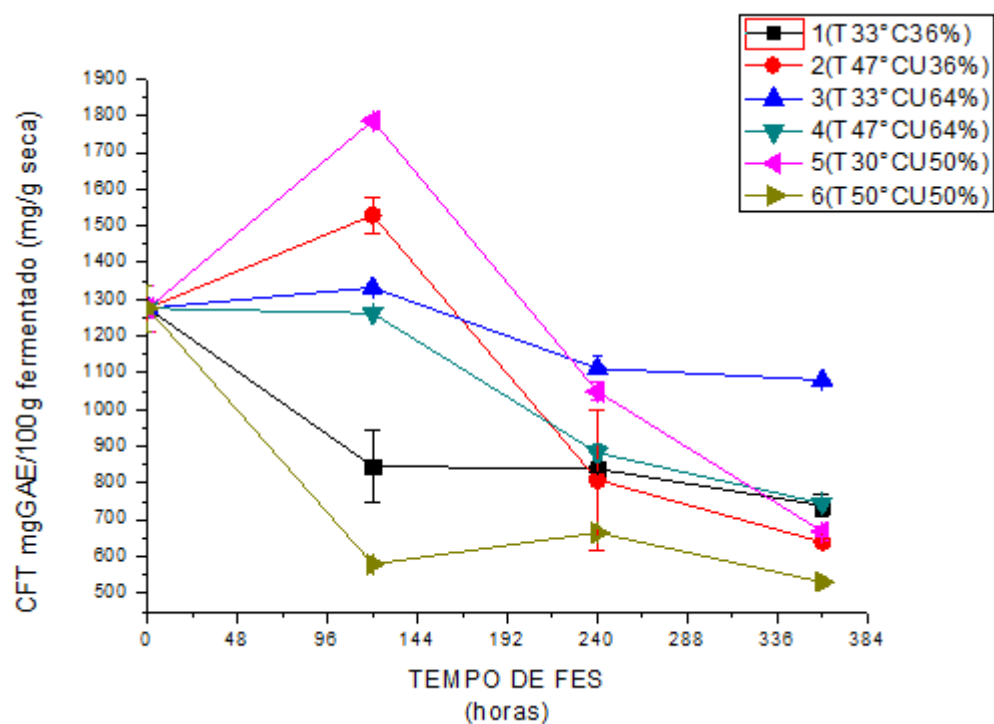
Cho *et al.* (2013) obtiveram aumento na quantidade de isoflavonas, gliconas e decréscimo de glicosídeos e isoflavonas em sojas. Os compostos epigalocatequina galato e epicatequina galato diminuíram durante a FES de *A. oryzae* em chá fermentado (KIM *et al.*, 2013). Lee *et al.* (2008) obtiveram aumento de compostos fenólicos e antocianinas após a fermentação de feijão preto, utilizando fungos filamentosos *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus azygosporus* e *Rhizopus* sp. Starynska-Janiszewska *et al.* (2008) obtiveram aumento no teor de compostos fenólicos e melhoria das propriedades anti-radicais de sementes cozidas de ervilhas após FES usando *Rhizopus oligosporus*. Zhang *et al.* (2008) observaram melhoria na composição química e a bioatividade de arroz velho após a FES com *Cordyceps sinensis*. Randhir & Shetty (2008) obtiveram aumento do teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante de feijão verde após de *Rhizopus oligosporus*. Ventura *et al.* (2008) obtiveram altas concentrações de ácidos gálico e elágico após a FES *Aspergillus niger* GH1 de extratos aquosos de tanino *Larrea tridentata*. Correia *et al.* (2004) verificaram que o enriquecimento fenólico do resíduo de goiaba pode ser obtido a partir FES de fungo filamentoso. Torino *et al.* (2013) obtiveram aumento de CFT de 24 mg EAG / g para 34-35 mg EAG / g de fermentado após a FES lentilhas com *Bacillus subtilis*.

É sabido que a ação das enzimas, tais como a  $\alpha$ -amilase, a fenilalanina-amoniolase, lacase e  $\beta$ -glucosidase, tanino hidrolase, elagitanino hidrolase, entre outras, desempenham um papel importante na biossíntese de compostos bioativos durante a FES (CHO *et al.*,

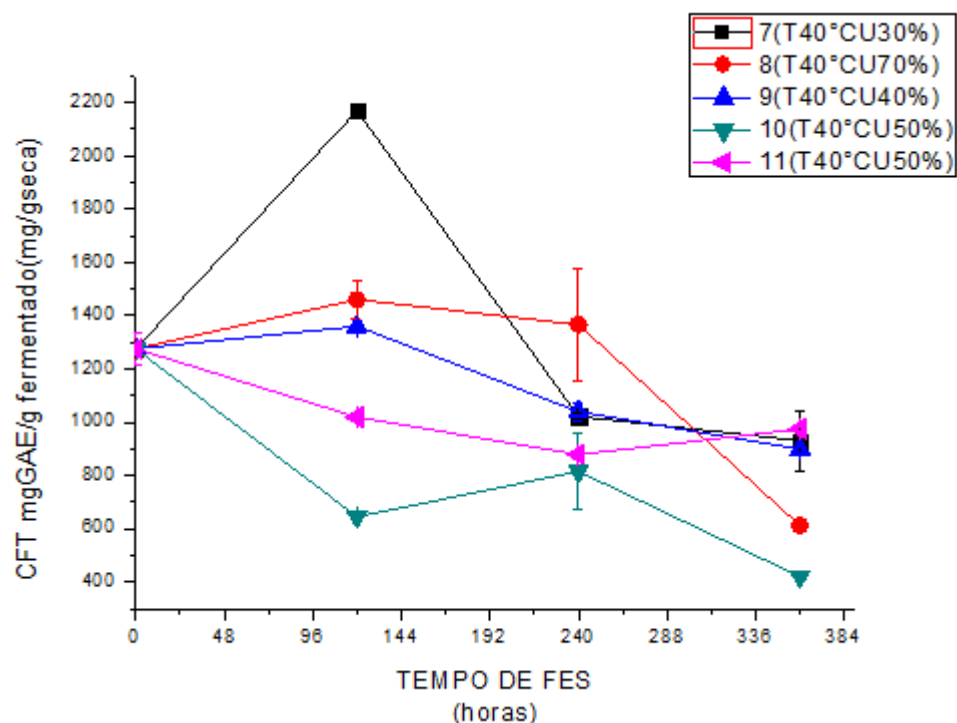
2009; ROBLEDO *et al.*, 2008). Estas enzimas produzidas pelos fungos através do sistema oxidativo lignolítico, pode degradar a lignina e abrir anéis fenólicos, aumentando desta maneira o conteúdo de compostos fenólicos no resíduo (SÁNCHEZ, 2009). Aguilera-Carbo *et al.*, 2009 também tem verificado que o *Aspergillus niger* GH1 apresentou capacidade de hidrolisar elagitaninos em ácido elágico durante FES usando como substrato o vegetal Larrea.

**Tabela 7:** Níveis decodificados e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial e produção de compostos de fenólicos e flavonóides totais durante a fermentação do resíduo de graviola.

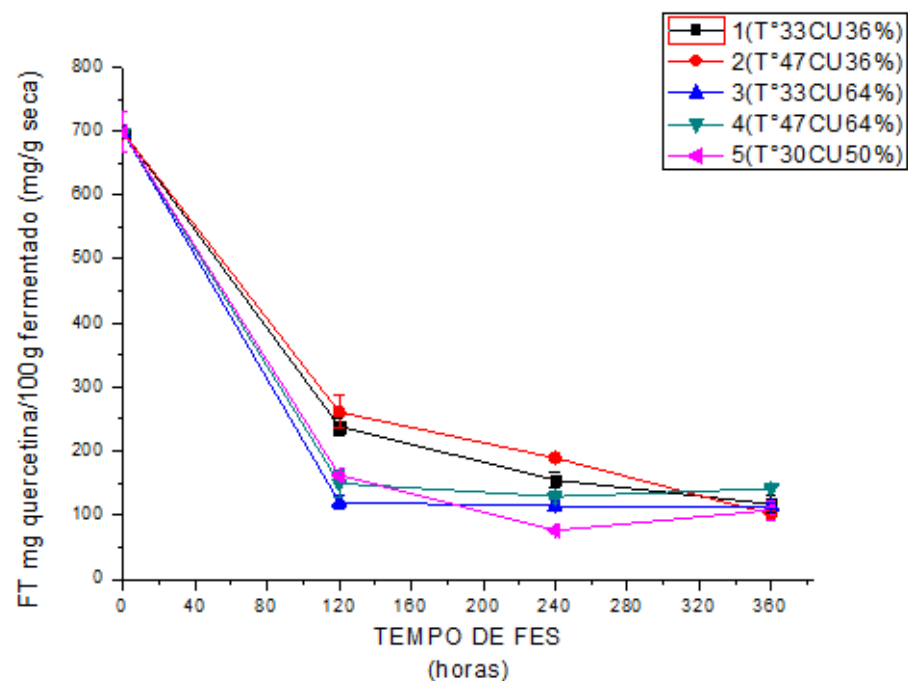
| Experi-<br>mentos | Fenólicos Totais (mg EAG/100g fermentado ) |          |                          |                    |                     |              | Flavonóides Totais (mg/100g fermentado) |                    |                   |             |
|-------------------|--------------------------------------------|----------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------|-----------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------|
|                   | Variáveis                                  |          | Tempo de Fermentação (h) |                    |                     |              |                                         |                    |                   |             |
|                   | T<br>(°C)                                  | U<br>(%) | 0                        | 120                | 240                 | 360          | 0                                       | 120                | 240               | 360         |
| 1                 | 33                                         | 36       | 1257±62,2                | 830,3±61,10        | 823,3±101           | 725,63 ±32,2 | 697,8 ±31,4                             | 238,4±13,0         | 154,9±12,1        | 117,1±14,2  |
| 2                 | 47                                         | 36       | 1257±62,2                | <b>1501,6±50,6</b> | 794,1±190           | 627,86±7,1   | 697,8 ±31,4                             | 260,9±25,4         | 189,4±8,5         | 101,3±4,2   |
| 3                 | 33                                         | 64       | 1257±62,2                | <b>1312,4±7,0</b>  | 1100,0±35,1         | 1094,6±35,5  | 697,8 ±31,4                             | 119,6±10,7         | 114,6±6,3         | 114,3±4,5   |
| 4                 | 47                                         | 64       | 1257±62,2                | 1243,9±3,5         | 870,5±21,8          | 735,8±11,1   | 697,8 ±31,4                             | 149,7 ±21,4        | 129,1±3,6         | 141,6±0,8   |
| 5                 | 30                                         | 50       | 1257±62,2                | <b>1758,9±3,5</b>  | 1034,5±25,1         | 660,4 ±12,7  | 697,8 ±31,4                             | 162,4±4,1          | 76,0±2,5          | 107,9 ±15,1 |
| 6                 | 50                                         | 50       | 1257±62,2                | 572,6±8,7          | 657,3±11            | 524,9±18,3   | 697,8 ±31,4                             | <b>686,3±6,0</b>   | <b>709,5±7,3</b>  | 115,7±14,6  |
| 7                 | 40                                         | 30       | 1257±62,2                | <b>2134,6±2,3</b>  | 1007,6±10,2         | 918,3±110    | 697,8 ±31,4                             | 73,7±16,1          | 68,5±0,0          | 64,0±5,2    |
| 8                 | 40                                         | 70       | 1257±62,2                | <b>1438,7±71,3</b> | <b>1345,5±208,7</b> | 605,0±3,5    | 697,8 ±31,4                             | <b>868,7 ±12,5</b> | <b>787,2±20,2</b> | 325,0±7,7   |
| 9                 | 40                                         | 50       | 1257±62,2                | <b>1307±100</b>    | 1024,5±32,9         | 886,7 ±15,6  | 697,8 ±31,4                             | 157,2±13,1         | 200,0±3,3         | 119,9±0,0   |
| 10                | 40                                         | 50       | 1257±62,2                | 644,1±10,7         | 812,8±134           | 420,8±7,7    | 697,8 ±31,4                             | 713,0±39,2         | 674,3±17,1        | 434,1±17,8  |
| 11                | 40                                         | 50       | 1257±62,2                | 1004,5±11,6        | 866,7±2,3           | 960,6±11,6   | 697,8 ±31,4                             | 322,92±14,7        | 185,5±28,8        | 126±1,27    |



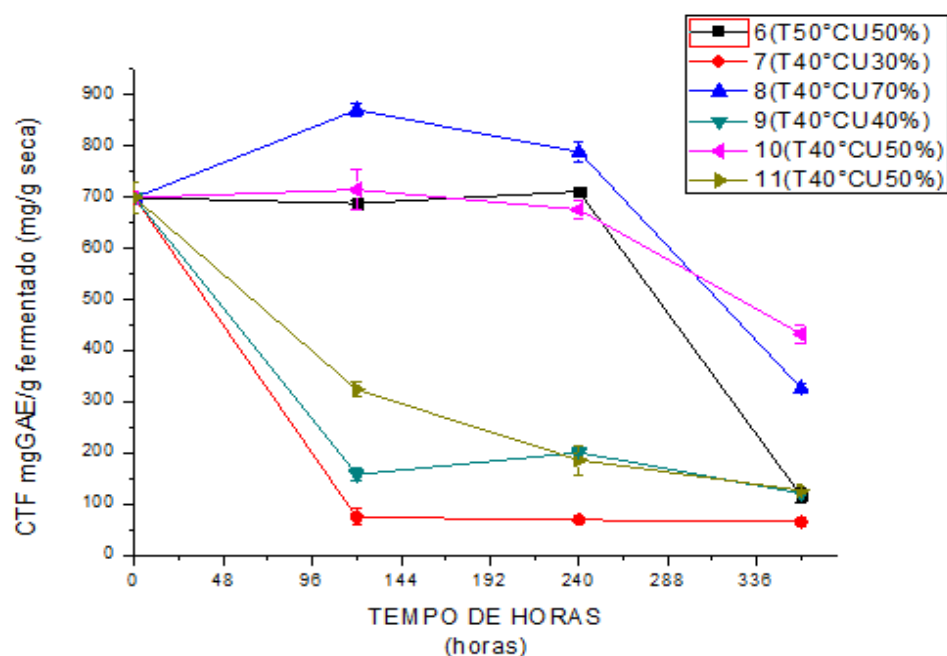
**Figura 14:** Quantificação de compostos fenólicos totais durante a FES por 360 h do resíduo de graviola utilizando *Aspergillus niger*. Experimentos de 1 a 6 .



**Figura 15:** Quantificação de compostos fenólicos totais durante a FES por 360 h do resíduo de graviola utilizando *Aspergillus niger*. Experimentos de 7 a 11.



**Figura 16:** Quantificação de flavonóides totais durante a FES por 360 h do resíduo de graviola utilizando *Aspergillus niger*. Experimentos de 1 a 5.



**Figura 17:** Quantificação de flavonóides totais durante a FES por 360 h do resíduo de graviola utilizando *Aspergillus niger*. Experimentos de 6 a 11.

Em relação aos flavonóides (Figuras 16 e 17), os fermentados 1, 2, 3, 4, 5,7, 9, 10 e 11 apresentaram uma diminuição no teor de compostos em relação ao resíduo não fermentado. Apenas nos fermentados 8 (obtido em temperatura 40°C e umidade 70%) e 6 (temperatura 50°C e Umidade 50%) obteve-se aumento de 24,5% e 1,7% em 120 e 240 h de fermentação, respectivamente.

Cho *et al.* (2009) na fermentação de “CheongGukJang” diminuiu em cerca de 25% o teor de isoflavona, a partir de um período de 3,322 mg/kg a 1054 mg/kg após 60 horas de fermentação. Cho *et al.* (2011) e Yang *et al.* (2006) também obtiveram redução de compostos fenólicos, isoflavonas e flavonóides após a fermentação de grãos de soja cozido utilizando *Bacillus pumilus* e *B. Subtilis*, respectivamente.

A diminuição de compostos bioativos (fenólicos e/ou flavonóides) após o processo fermentativo pode estar associada a não germinação do fungo impedida pela combinação de fatores limitantes, tais como, maturação dos esporos, ausência de água ou das fontes apropriadas de carbono e nitrogênio, limitações físicas ambientais, como temperatura ou pressão osmótica desfavoráveis e presença de compostos tóxicos (RUFINO *et al.*, 2010; THAN *et al.*, 2005). Desta forma provavelmente alguns destes fatores podem ter influenciado, no processo fermentativo, fazendo com que o fungo, não biodisponibilizasse, ou aumentasse os compostos nos fermentados de graviola. Santos *et al.* (2006) expõe que, quando se trata de fungos filamentosos, a germinação de esporos inoculados, a taxa de crescimento específico, a síntese de enzimas extracelulares e metabólicos secundários influenciam na fase final de esporulação, fatos esses que provavelmente contribuem para a diminuição dos compostos no processo de FES.

Jamal *et al.* (2011), relatam que a diminuição no teor dos compostos após o processo fermentativo esteja relacionado com o esgotamento dos nutrientes, sendo assim, o micro-organismo começa a utilizar os compostos fenólicos como substrato e, finalmente, resulta numa diminuição do CFT. Alguns dos componentes do meio, presente no substrato, pode ter o elevado teor, contribuído para se obter efeito negativo na produção e/ou aumento dos compostos.

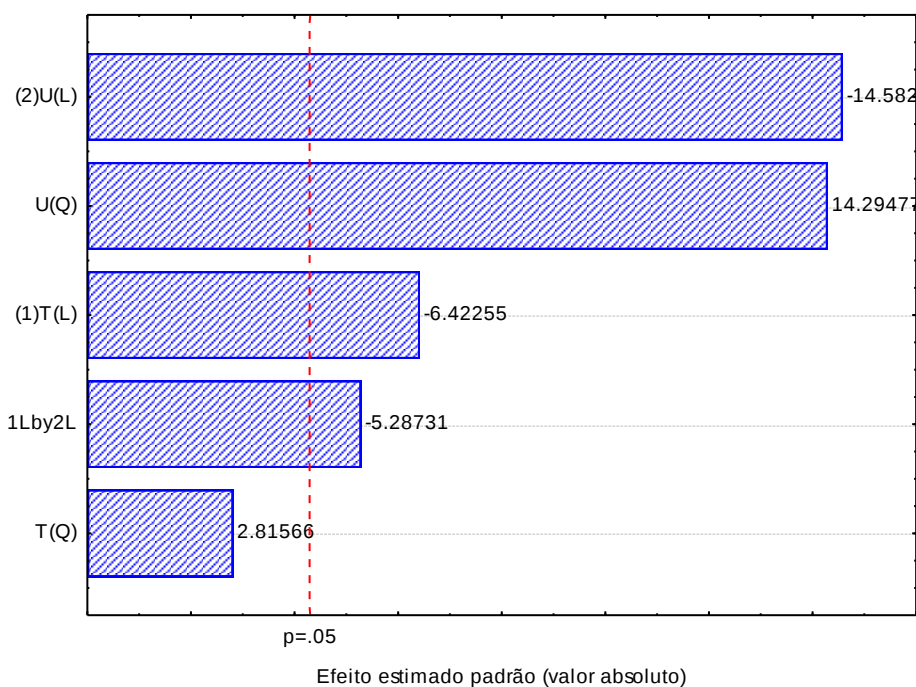
A FES é uma estratégia eficaz para o enriquecimento de fitoquímicos bioativos em substratos vegetais, dentre eles os compostos fenólicos. Para McCue & Shetty (2005), a investigação de aproveitamento biotecnológico de substratos agroindustriais por fungos comestíveis, além da identificação e caracterização das enzimas envolvidas no mecanismo

de obtenção, acarretaria no desenvolvimento de estratégias mais eficientes para obtenção de ingredientes funcionais.

Modelos estatísticos foram empregados com sucesso em muitos processos de fermentação para a redução do custo de produção com um rendimento mais elevado (SANTOS, 2007). No entanto, nenhum estudo foi realizado para a otimização do processo de produção de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes através da fermentação em estado sólido de resíduos de graviola utilizando o *Aspergillus niger*.

#### 5.4. Influência de parâmetros na produção de compostos bioativos por FES do resíduo de graviola

Os valores máximos de fenólicos totais e flavonóides totais de cada experimento (Tabela 9) E2(Temperatura 47°C e Umidade 36%), E3(Temperatura 33°C e Umidade 64%), E5 (Temperatura 47°C e Umidade 64%), E7 (Temperatura 30°C e Umidade 50%), E8(Temperatura 40°C e Umidade 70%) e E9(Temperatura 40°C e Umidade 50%), foram analisados estatisticamente para avaliar a influência dos parâmetros umidade e temperatura de fermentação na FES. O gráfico de pareto demonstrou ao nível de 95% de significância ( $p < 0,05$ ) que a umidade linear e quadrática, a temperatura linear e a interação entre a temperatura e a umidade foram os parâmetros que influenciaram significativamente na produção dos compostos fenólicos. Entretanto o coeficiente de correlação foi 0,52 e pela Tabela Anova (Tabela 8) verificou-se que o  $F_{calculado}$  foi menor que  $F_{tabelado}$ , isto significou que o modelo estatístico não é válido para o processo. Para o modelo empírico ser validado é necessário que  $F_{calculado}$  seja maior que  $F_{tabelado}$ , significando que existe uma boa correlação entre os dados experimentais e os dados propostos pelo modelo. Em relação aos flavonóides através do tratamento estatístico obteve-se que nenhum dos parâmetros foi significativo para a produção dos compostos.



**Figura 18:** Gráfico de pareto da obtenção de compostos fenólicos por fermentação em estado sólido. U= umidade, T = temperatura.

**Tabela 8:** Análise de variância para produção de fenóis por FES a partir do resíduo de graviola.

| Fonte de Variação | Soma Quadrática (SQ) | Graus de Liberdade (GL) | Média Quadrática (QM) | F calculado |
|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------|
| Regressão         | 91889,8              | 4                       | 22972,45              | 1,88        |
| Resíduo           | 85288,5              | 7                       | 12184,07              | -           |
| Falta de ajuste   | 84912,5              | 3                       | -                     | -           |
| Erro puro         | 376                  | 2                       | -                     | -           |
| Total             | 177178,3             | 10                      | -                     | -           |

Coefficiente de correlação  $R^2 = 0,52$  ;  $F_{tab_{GL_{regressão}; GL_{resíduo}; nível\ de\ significância}} = 5,05$ .

Tendo os fermentados 2, 5, 7, e 8 apresentado aumento na produção de compostos fenólicos totais em 120 h de fermentação, estes foram analisados quanto a capacidade antioxidante utilizando os métodos DPPH, FRAP e ABTS e foram realizadas análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com o intuito de identificar a produção de compostos de interesse para a indústria de alimentos.

### 5.5. Capacidade antioxidante dos fermentados de resíduos de graviola

A capacidade antioxidantes dos fermentados obtidos em 120h de fermentação nos experimentos 2, 5, 7, e 8 (onde obteve-se os maiores teores de compostos fenólicos) foi determinada através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP. Os resultados estão demonstrados na Tabela 9 e na Figura 19.

O método DPPH é considerado como sendo um método confiável e de fácil realização para a determinação da capacidade antioxidante em extratos de frutas (RUFINO *et al.*, 2010).

Os resultados da atividade antioxidante pelo ensaio ABTS<sup>+</sup> são expressos em valor de TEAC (capacidade antioxidante total do composto equivalente ao Trolox), que é definido como a concentração de  $\mu\text{M}$  trolox/ g de fruta. Assim, quanto maior for o valor de TEAC, mais forte é o potencial antioxidante.

Segundo Pulido *et al.* (2000) o uso de diferentes solventes influencia o poder redutor da amostra analisada, e a eficiência antioxidante determinada pelo método FRAP depende do potencial redox dos compostos analisados, caracterizado pela complexidade de suas moléculas. Vatterm & Shetty (2003), avaliaram a liberação de fenólicos em suas formas glicolisadas, levando ao aumento da funcionalidade dos mesmos, já que os fenólicos, poliméricos apresentam capacidade antioxidante, e, por conseguinte, efeito benéfico à saúde, reduzidos.

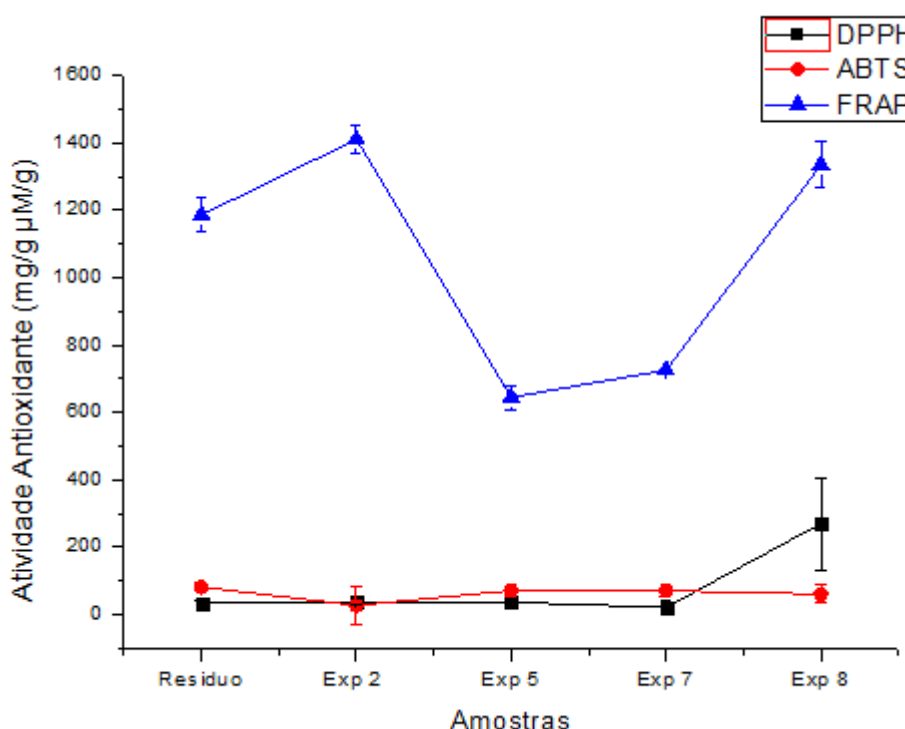
**Tabela 9:** CFT e capacidade antioxidante dos fermentados obtidos em 120 h de FES e do resíduo de graviola não fermentado.

| Amostras               | CFT (mg EAG/100g de resíduo) | DPPH $\text{EC}_{50}\text{g}^{-1}$ | ABTS $\mu\text{M}$ trolox/ g | FRAP $\mu\text{M}$ sulfato ferroso/g |
|------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Resíduo não fermentado | 1257 $\pm$ 62,2              | 33,71 $\pm$ 7,0                    | 81,37 $\pm$ 14               | 1185,9 $\pm$ 50,65                   |
| Exp. 2                 | 1529,0 $\pm$ 50,6            | 37,04 $\pm$ 9,8                    | 27,19 $\pm$ 54               | 1410,35 $\pm$ 41,41                  |
| Exp. 5                 | 1786,9 $\pm$ 3,5             | 37,04 $\pm$ 8,8                    | 70,99 $\pm$ 16               | 645 $\pm$ 35,35                      |
| Exp. 7                 | 2169,4 $\pm$ 2,3             | 21,23 $\pm$ 17,5                   | 70,54 $\pm$ 17               | 725,67 $\pm$ 8,01                    |

|        |             |             |          |              |
|--------|-------------|-------------|----------|--------------|
| Exp. 8 | 1460,8±72,6 | 270,3±136,9 | 60,54±27 | 1334,7±669,1 |
|--------|-------------|-------------|----------|--------------|

CFT: compostos fenólicos totais; Média ± Desvio padrão (triplicata); Exp 2 (T47°C U36%), Exp 5 (T30°C U50%) Exp 7 (T40°C U30%) Exp 8 (T40°C U70%)

Pelos métodos DPPH e FRAP a maior capacidade antioxidante foi obtida nos fermentados 8 e 2 (Tabela 9 e Figura 19), e em relação ao ABTS, os fermentados apresentaram menores valores de capacidade antioxidante ao ser comparado com o resíduo não fermentado. O fermentado obtido no experimento 8 foi o que alcançou maior concentração de 270,3 g/g de DPPH, sendo a menor concentração obtida (21,23 g/g de DPPH) no fermentado do experimento 7. Cho *et al.* (2009) conseguiram um aumento de 54,5% para 96,2% da atividade anti radical DPPH em 60 h de fermentação com soja.



**Figura 19:** Capacidade antioxidante dos extratos fermentados e não fermentado da farinha de graviola, através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP.

Kim *et al.* (2013) alcançaram com a fermentação de chá verde, um aumento da capacidade antioxidante de 121,62 para 130,66 mg de Trolox pelo método ABTS.

Lee *et al.* (2008) obtiveram um aumento da atividade antioxidante equivalente a EC<sub>50</sub> 3,83 mg/mL em relação a ao extrato aquoso de soja fermentada com *Monascus MFS-31499*. Como pode ser observado este valor encontrado por Lee *et al.* (2008) é inferior aos encontrados na farinha de graviola, assim como nos fermentados. Rufino *et al.* (2010) apresentaram uma relação inversa nos compostos fenólicos na polpa de mangaba fresca de 169 mgEAG/100g, para uma capacidade antioxidante de 3385 EC<sub>50</sub> (g DPPH/g).

Miyaoka (2012) relatou um aumento da ação antioxidante pelo método DPPH, no fermentado de soja. Colussi *et al.* (2013) obtiveram aumento da capacidade antioxidante de 69,15 para 74,58 mmol de ácido ascórbico na biofarinha de maçã fermentada com *A brasiliensis*, em relação a não fermentada. Torino *et al.* (2011) em extratos fermentados de lentilha por *B. subtilis*, obtiveram níveis de ORAC de 0,17 para 0,22 e 0,24 mmol TE/g em 48 e 96 h de FES respectivamente. Kim *et al.* (2009)b e Dueñas *et al.* (2005), a partir de resultados similares em seus trabalhos, também obtiveram um aumento na capacidade antioxidantes dos fermentados. No trabalho reportado por Torino *et al.* (2013) a capacidade antioxidante da fermentação de lentilha por *B. Subtilis*, foi medida pelo método ORAC, que elevou os níveis de 0,17 para 0,22 e 0,24 mmol TEAC/g em 48 e 96 h, respectivamente.

Apesar das limitações, ambos os testes são validados, reconhecidos e utilizados na grande maioria dos estudos conduzidos atualmente. O DPPH apresenta sua eficiência por ser um método prático, rápido além de incluir um radical estável e que ao contrário de outros métodos, não precisa ser gerado na própria reação (HUANG *et al.*, 2007).

Vale ressaltar que é importante, compreender que cada método analisa uma determinada característica específica do composto presente. Deve-se evitar o uso da expressão “capacidade antioxidante total” quando se utiliza apenas um número restrito de métodos de análise da atividade antioxidante, já que esse termo inclui vários mecanismos de atuação (capacidade de inibição de enzimas oxidantes, capacidade sequestradora de espécies ROS, capacidade quelante, etc) sendo assim inviável de se abordar apenas em um único método (HUANG *et al.*, 2007).

Os fermentados obtidos nos experimentos 2 (Temperatura 47°C/Umidade do resíduo 36%), 5 (Temperatura 30°C/Umidade do resíduo 50%), 7 (Temperatura 40°C/Umidade do resíduo 30%) e 8(Temperatura 40°C/Umidade do resíduo 70%) e o resíduo não fermentado foram analisados em HPLC para identificação e quantificação de compostos bioativos de interesse.

## 5.6. Identificação e quantificação de compostos bioativos

Os fermentados de resíduo de graviola obtidos nos experimentos 2 (Temperatura 47°C/Umidade do resíduo 36%), 5 (Temperatura 30°C/Umidade do resíduo 50%), 7 (Temperatura 40°C/Umidade do resíduo 30%) e 8 (Temperatura 40°C/Umidade do resíduo 70%) e o resíduo não fermentado foram analisados em HPLC para identificação e quantificação de compostos bioativos de interesse. Os compostos identificados estão demonstrados na Tabela 10 e nos cromatogramas apresentados nas Figuras (ANEXO III).

No resíduo de graviola não fermentado foi identificado o ácido p-cumárico com concentração de 130,55 mg/100 g de amostra. Já no fermentado 2 identificou-se apenas o composto ácido protocatecuico na concentração de 30,99 mg/100g, composto este não identificado no resíduo não fermentado. Nos fermentado 5 e 7 foi identificado o ácido protocatecuico, o qual não esteve presente no resíduo de graviola não fermentado. É provável que nestas condições de fermentação dos experimentos 5 e 7 houve uma degradação deste composto não identificado. Por outro lado, no fermentado 8 houve aumento na concentração composto não identificado em relação a concentração deste no resíduo não fermentado.

**Tabela 10:** Compostos bioativos identificados no resíduo de graviola e nos fermentados obtidos em 120 h de fermentação através das análises em HPLC.

| Amostras                           | Composto             | Tempo de retenção (min) | Concentração (mg/100g de amostra) | Comprimento de onda (nm) |
|------------------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Resíduo de graviola não fermentado | Ácido p-cumárico     | 20,18                   | 130,55                            | 310                      |
| Fermentado 2                       | Ácido protocatecuico | 7,27                    | 30,99                             | 254                      |
| Fermentado 5                       | Ácido protocatecuico | 7,20                    | 45,47                             | 254                      |
| Fermentado 7                       | Ácido protocatecuico | 7,37                    | 30,99                             | 254                      |

Devido ao fato de que na natureza, os polifenóis ocorrem conjugado com açúcares e ácidos orgânicos, a comparação entre os espectros e o tempo de retenção com os padrões

disponíveis não permite a identificação completa da maioria dos compostos presentes nas amostras, em alguns casos, a baixa concentração do composto no extrato, eluição da amostra, ou interação do solvente, não permite a identificação clara dos compostos (AHERNE & O'BRIEN, 2002).

O estudo dos compostos fenólicos de um modo geral, e especificamente dos ácidos fenólicos, considera-se de máximo interesse por se encontrarem ligados a maior parte de fenômenos biológicos, botânicos, genéticos dentre outros. Considerando-se a necessidade emergente de subprodutos com capacidade antioxidante, a extração desses compostos bioativos na forma de ácidos como encontrados no resíduo de graviola, contribui em menores custos de produção e obtenção desses compostos a partir de fontes biodegradáveis (SOUSA, 2012; ACHKAR *et al.*, 2013).

Outros pesquisadores também tem identificado compostos nos fermentados, tais como Kim *et al.* (2005) os quais identificaram os compostos ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido p-cumarico, ácido vanílico, ácido clorogênico, ácido benzoico, ácido genticônico, ácido salicílico, ácido p-hidroxibenzoico o ácido trans-cinâmico no fermentado do resíduo de soja negra. Romani *et al.* (2003) identificaram no fermentado de soja *Bacillus subtilis*, ácido cafeico, o ácido ferúlico, o ácido siríngico, ácido protocatecuico, ácido p-cumárico, ácido genticônico e ácido p-hydroxylbenzoic. Genovese & Lajolo (2001) identificaram na soja fermentada com *Rhizopus sp.* após 72 h os compostos diadzeína e genisteína. Jamal *et al.* (2011) após a fermentação de óleo de palma com o *Aspergillus niger*, identificaram ácido gálico, protocatecuico, 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxifenilacético, caféico, siríngico, p-cumárico, ferúlico e um composto desconhecido nos fermentados e não fermentados. Miyaoka (2012) identificaram e quantificaram substâncias antioxidantes (ácido gálico, ácido ferúlico, rutina, miricetina, trans-cinâmico e caempferol) em fermentados de grão de soja (orgânica) por *Rhizopus LPB-R.05*.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliado o potencial dos resíduos de graviola, mangaba e acerola para a obtenção de compostos bioativos (fenólicos e flavonóides) por fermentação em estado sólido utilizando o micro-organismo *Aspergillus niger*. Maior extração dos compostos bioativos dos resíduos foi obtido com solução de acetona a 80%, tendo o resíduo de acerola apresentado a maior quantidade de compostos fenólicos totais (2051,7 mg EAG/100g seca de resíduo), seguido do resíduo de graviola (1257 mg EAG/100g seca de resíduo) e em menor concentração a mangaba 90,89 mg EAG/100g seca de resíduo.

A FES do resíduo de graviola proporcionou um aumento de compostos fenólicos em relação ao resíduo não fermentado em 7 das 11 condições experimentais realizadas em 120 h de fermentação. A capacidade antioxidante também foi aumentada após a fermentação, tendo o extrato do fermentado 5 (obtido em temperatura 40°C e umidade do resíduo 70%) apresentado maior capacidade antioxidante pelo métodos DPPH, ABTS e FRAP que o resíduo não fermentado. Nos fermentados 2, 5, 7 e 8 foram identificados alguns compostos, sendo obtido no fermentado 8 a máxima produção de um composto não identificado com pico próximo ao do padrão ácido ferúlico.

A fermentação em estado sólido do resíduo de graviola com o micro-organismo *Aspergillus niger* proporcionou um aumento no teor de compostos fenólicos totais, sendo possível obter compostos de interesse não encontrados no resíduo não fermentado, demonstrando o potencial deste resíduo para aplicações futuras em processos biotecnológicos de interesse industrial.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n. 2, v. 2, p. 394-400, 2007.

ABUD, A. K.S.; NARAIN, N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 12, n. 4. p.257-265, 2009.

ACHKAR, M. T.; NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; VILEGAS, W. Propriedade de aantioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 11. N. 2, p. 398-406, 2013.

AGUILAR, C.N.; AGUILERA-CARBO, A.; ROBLEDO, A.; VENTURA, J; BELMARES, R.; MARTINEZ. Production of antioxidants nutraceuticals by solid-state cultures of pomegranate (*Punica granatum*) peel and creosote bush (*Larrea tridentata*) leaves. *Food and Technological Biotechnological*, v. 46:218–22, 2008.

AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; MUITSAI, S.; PARK, Y.K. Transformações enzimáticas de flavonóides, *Boletim do CEPPA*, v. 25, n. 1, p. 61-76, 2007.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism, *Nutrition*, v.18, p. 75-81, 2002.

ÁJILA, C.M.; NAIDU, K. A.; BHAT, S. G.; RAO, U. J. S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*. v. 105, p. 982-988. 2007.

ÁJILIA, C.M.; BRAR, S.K.;VERMA,M.; TYAGI, R.D.; VALERO, J.R. Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium*– Liberation and extraction of phenolic antioxidants, *Food Chemistry*, v. 126, p. 1071–1080, 2011.

ALMEIDA, M.MB.; SOUSA, P.H.M.; MARTHA, A.; ARRIAGA, C.; PRADO, G.M.; MAGALHÃES, C.E.C.; MAIA, AM.; LEMOS, T.L.G. Bioactive compounds and

antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeaster Brasil, Food Research Intrenational, v. 44, p. 2155-2159, 2011.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications**; CRC Press, Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.

ANWAR, S.; ALI, S.; SARDAR, A.A. Citric acid fermentation of hydrolysed raw strarch by *Aspergillus niger* IIB-A6 in stationar culture, Sindh Research Universitaria Journal, v. 41, p. 01-08, 2009.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos- Uma breve revisão. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 66, p. 1-9, 2007.

ARAUJO, K. B.; SANTOS, R. C.; SOUZA, F.M.; AQUINO, L.C.L, Enriquecimento protéico da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopu oryzae*: otimização utilizando a metodologia de superfície de resposta. Tecnologia & Ciência Agropecuária, João Pessoa, v.5, n.4, p.45-50, 2011.

ARAÚJO, C; CAETANO, A. C. S.; MELO, E. A.; LIMA, V. L.G.; R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. Brazilian Journal of Food Technologica, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2008.

ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Portaria nº18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes para utilização da alegação de propriedades funcionais ou de saúde, 2009.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, v. 99. p. 191–203, 2006.

BALESTRO, E.A; ROSELI, G.S.; FONTANA, C. Utilização de bagaço de uva com atividade antioxidante na formulação de barras de cereais. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.13, n.2, p.203-209, 2011.

BAGETTI, M.; FACCO, E. M. P.; RODRIGUES, D.B.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. Ciência Rural, v. 39, n. 8, p.2504-2520, 2009.

BARBOSA, E.S.; PERRONE, D.; VENDENDRAMINI, A.L.A.; LEITE, S.G.F. Vanillin production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on green coconut agro-industrial husk in solid state fermentation. *Bioresources*, v. 3, p. 1042–50, 2008.

BARBOSA, M. M. Obtenção de carotenóides e flavonóides a partir do bagaço do pendúculo do caju por maceração enzimática. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010. 119f.

BARRETO, G.P.M. Carotenóides e compostos bioativos:relação com propriedades anti-radical livre e corante em frutas tropicais. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. 2008.189p.

Barrios-González et al, 2005 J. Barrios-González, F.J. Fernández, A. Tomasini, A. Mejía. Secondary metabolites production by solid-state fermentation. *Malays Journal of Microbiology*, v. 1, p. 1–6, 2005.

BARROS, J.Â.C; FIDELIS, G.P.; COSTA, L.S. LIMA, J. A.ROCHA, H.A.O. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de frutas tropicais. Disponível em:<<http://www.sbpnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/4903>>Acesso em: 23 de Out de 2012.

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 881–96, 2003.

BEUX, M. R.; SOCCOL, C. R. Microbiota isolada durante as fases de pré e pós colheita dos grãos de café associada à qualidade e sanidade da bebida. *Boletim do CEPPA*, v. 22, n.1, p. 155-172, 2004.

BHANJA, T.; KUMARI, A.; BANERJEE, R. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. *Bioresource Technology*, v. 100, p.2861–6, 2009.

BLOOR, S.J. FRANKLAND, J., THOMAS, M., ROBSON, K. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Methods in Enzymology*, v.335, p 3-14, 2001.

BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Editora Interciência. 2008.

BORGES, K.C. Estudo das características físico-químicas e funcionalidade de bagaços de frutas tropicais desidratados em leite de jorro. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química., 2011. 138f

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V. TORRES, R.P.; AZERREDO, H.M.C.; ALVES, R.L.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidantes dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudo fruto de caju (*Anacartium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n. 4, p.902-908, 2007.

CAETANO, A.C.S.; MELO, E.A. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola, *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.

CAETANO, A.C.S.; MELO, E.A.; LIMA, V.L.A.G.; MACIEL, M.J.S.; ARAUJO, C.R. Compostos fenólicos e atividades antioxidante em resíduos de acerola (*Malpighia emarginata* D.C). (2008). Disponível em: <  
<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0537-2.pdf>> Acesso: em 21 de Out de 2012.

CAETANO, A.C.S.; MELO, E.A.; LIMA, V.L.A.G.; MACIEL, M.J.S.; ARAUJO, C.R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.

- CAETANO, A.C.S. Potencial antioxidante de extratos de resíduos de acerolas (*Malpighia Emarginata* D.C.) em diferentes sistemas modelos e na estabilidade oxidativa de soja. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Ciências Domésticas, 2009. 113f.
- CATANEO, C.B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L.V.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico de resíduo agroindustrial da produção de vinho. *Semina: Ciências Agrárias*, v.29, p.93-120, 2008.
- CARVALHO, J.C.; PANDEY, A.; OISHI, B.O.; BRAND, D.; RODRIGUEZ-LÉON, J.A.; SOCCOL, C.R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. *Journal Biochemistry Engineering*, v.29, p.262–269, 2006.
- CASANO, A.; DRIOLI, E.; GALAVERNA G.; MARCHELLI, R.; DI-SILVESTRO, G.; CAGNASSO, P. Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes *Journal of Food Engineering*, v. 57, p. 153 – 163, 2008.
- CAO, G.; VERDON, ALESSIO, H. M C. P.; WU, A. H.; WANG, H.; PRIOR, R. L.; CLIN. Mycelial propagation and enzyme production in koji prepared with *Aspergillus oryzae* on various rice extrudates and steamed rice, *Free Radical Biology & Medicine*, v. 41, p.1738, 1993.
- CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; KOUL, S.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. *Arthrobacter* sp. lipase immobilization for improvement in stability and enantioselectivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, p. 598-606, 2006
- CHO, I.H.; NAMGUNG, H.J.; CHOI, H.K.; KIM, Y.S, Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chemistry*, v. 106, p. 71–76, 2009.
- CHO, K. M.; HA, T. J.; LEE, Y. B.; SEO, W. D.; KIM, J. Y.; RYU, H. W.; JEONG, S. H.; KANG, Y, M.; LEE, J. H. Soluble phenolics and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* L.) cultivars with varying seed coat colours, **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1065-1076, 2013.

CHEUNG, I. M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, v. 81, p. 249-255, 2003.

CHOUNG, M-G.; BAEKL, Y.; KANGS, T.; HAN, W.Y.; SHIN, D.C.; MOON, H.P. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Agronomic Food and Chemistry*, v. 49, p. 5848–51, 2001.

COINU, R.; CARTA, S.; URGEHE, P.P.; MULINACCI, N.; PINELLI, P.; FRANCONI, F. Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke. *Food Chemistry*, v. 101, p. 524–531, 2007.

COLUSSI, T.C.; BENETTI, C.; BOVO, F.; SANTA, H.S.D.; PEREZ, E. Avaliação da capacidade antioxidante de uma biofarinha de maçã obtida com *Agaricus brasiliensis* frente ao complexo fosfomolibidênico. *Revisata Ciências Exatas e Naturais*, v. 15, n. 1, 2013.

CONFORTI, F.; MENICHINI, F.; FORMISANO, C.; RIGANO, D.; SENATORE, F.; ARNOLD, N.A. Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area. *Food Chemistry*, v. 116, p. 898–905, 2009.

CÓRDOVA, K. V.; SANTA, H. S. D.; SANTA, O. R., PEREZ, E.; WASZCYNISKYJ, N. Antioxidantes e beta-glucanas em barras de cereais com *Agaricus brasiliensis*. *Boletim do CEPPA*, v. 30, n. 2, p. 209-220, 2012.

CORREIA, R.T.P.; MAGALÃES, M.M.A.; MC-CUE, P.; MACEDO, G.R.; SHETTY, K. Phenolic antioxidant enrichment of soy flour-supplemented guava waste by *Rhizopus oligosporus* mediated solid-state bioprocessing. *Journal Biochemistry Engineering*, v.28, p.404, 2004.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry- a review. *Journal of Food Engineering*, v. 76, pg. 291-302, 2006.

DANTAS, E.M.; AQUINO, L.C.L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.12, n.1, p.81-87, 2010.

DAVID, C. Q. A. J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos, Química Nova, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

DO DIEM, Q.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L.; HUYNH, L. H.; SOETAREDJO, F. E.; ISMADJI, S.; JU, Y. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*, Journal of Food and Drug Analysis, Available online 18 December 2013. Disponível <em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949813001348>>.

DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation**. Elsevier Applied Science, London and New York, 1995.

DUEÑAS, M.; FERNÁNDEZ, D.; HERNANDÉZ, T.; ESTRELLA, I.; MUÑOZ, R. Bioactive phenolic compounds of cow peas (*Vignasinesis L.*). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. Journal Science Food Agronomy. v.85: p. 297–304, 2005.

DUEÑAS, M.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I. Comparative study of the phenolic Composition in lentils processed with and without addition of commercial tannase. Journal of Food Processing and Preservation, v. 33, p. 695–713, 2003.

DUXBURY, D. Antioxidant analysis: Measuring disease fighters. Food Techonology, v.59, n.3, p.56-58, 2005.

ELLAIAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K. Optimisation studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinensis* in solid state fermentation. Process Biochemistry, v. 39, p. 529–53, 2004.

ESAKI, N.; SUZUKI, T.; NAKAYAMA, T.; KURIHARA, T., Cold-active lipolytic activity of psychotrophic *Acinetobacter* sp. strai, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, p. 144-148, 2001.

FARINAS, C.S. LEMO, S.F.; LEMO, V.; RODRIGUEZ-ZUÑIGA, U.F.; BERTUCCI, V.; COURI, N.L. **Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. 13 p

FAO- Food and Drug Administration (2007). **Oficina Regional para América Latina y el Caribe** (Tabla de composición de alimentos de América Latina) Disponível em: <<http://www.rlc.fao.org/bases/alimento/grupo.htm>> Acesso em: 12 out. 2012.

FAO- **Food and Drug Administration**. (2010). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acessado: 17 de Out 2012.

FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 263, 8-13, 2007.

FERREIRA, A.N.; PACHECO, C.S.V.; TAVARES, I.M.M.C.; ROCHA, T.J.R.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo de cajá. *Revista Acadêmica Ciências Agrária Ambiental*, v. 9, n. 2, p. 207-213, 2011.

FERREIRA, M.R.A.; SANTIAGO, R.R.; RIBEIRO, J.S.; MELLO, J.C.O.; SVIDZINSK, T.I.E.; SOARES, L.A.L. Avaliação da influência de solvente e processo extrativo sobre a atividade antifúngica de extratos brutos obtidos de espécies vegetais presentes no Nordeste Brasileiro. (2012). Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/7/982-13987.htm>> Acessado em 18 de Outubro de 2013.

FERNANDEZ-OROZCO, R.; MUÑOZ, F. R.; ZIELINSKI, H.; PISKULA, M.K.; KOZŁOWSKA, H. Fermentation as a bio-process to obtain functional soybean flour, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 8972–8979, 2007.

FOOD INGREDIENTES BRASIL. Dossiê antioxidantes: Os antioxidantes. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>> Acesso em: 24 Set, 2009.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de sojas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 11, p. 86-93, 2001.

GHOSHAL, G.; BASU, S., SHIVHARE, US. Solid state fermentation in processing, *Internacional Journal of Food Engineering*. v. 8, n.3., 2012.

GONZÁLEZ, J. B. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications, *Process Biochemistry*, v. 47, p.175–185, 2012.

GRAMINHA, E.B.N., GONÇALVES, A.Z.L., PIROTA, R.D.P.B., BALSALOBRE, M.A.A., SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Food Science Technological*, v.144. p.1–22, 2008.

GUALBERTO, N. C. **Identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD em polpa de frutas de cajá-umbu (*Spondia spp*) e graviola (*Annona muricata*).** (Dissertação) Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

GUILHERME, D.O; SANTOS, A.M; ARAUJO, C.B; SANTOS, W.G. Ecogeografia e etnobotânica da mangaba (*Hancornia speciosa*) no Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, n.1, p. 414-416, 2007.

GUIMARÃES, L.H.S.; SOMERA, A.F.; TEREZINI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; JORGE, J.A. Production of  $\beta$ -fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. *Process Biochemistry*, v. 44. p.237, 2009.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, Washington, v. 23, n. 12, p. 1719-1726, 2003.

HAM, S.S.; KIM, S.H.; MOON, S.Y.; CHUNG, M.J.; CUIC, B.; HAN, E.K. Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental*, v. 9, p. 642- 555, 2009.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, p. 175-186, 2004.

HUANG, X.J.; GE, D.; XU, Z.K. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*, v. 43, p. 3710–3718, 2007.

HUBERT, J. M.; BERGER, F.; NEPVEU, F.; PAUL, J.; DAYDÉ. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chemistry*, v. 109, p. 709–721, 2008

KHANAM, U. K. S.; OBA, S. YANASE, E.; MURAKAMI, Y. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables, *Journal of Functional Foods*, v.4, October, p. 979–98, 2012.

KIM, M. I.; HAM, H. O.; O., S. –D.; PARK, H. G.; CHANG, H. N.; CHOI, S. –H. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*, v. 39, p. 62-68, 2007.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONOSCO, A. M.; MANCINI FILHO, J.; FETT, R., Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 726-32, 2006.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARILLA, M.C.; FETT, R. Actividad antioxidant de pigmentos antocianicos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n.4, 691-693, 2005.

HENRIQUEZ C.; ALIAGA. C.; LISSI, E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. *International Journal Chemical Kinetics*; v.34, n.12, p. 659-65, 2006.

HERNÁNDEZ, J.S.; AGUILERA-CARBÓ, A.F.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; MARTÍNEZ, J.L.; AGUILAR, C.N. Kinetic production of the antioxidant ellagic acid by fungal solid state culture. Proceedings of the 10th international chemical and biological engineering conference. Portugal: CHEMPOR, p. 1849–54, 2008.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, p. 175-186, 2004.

HUBER, J., BERGER, M.; NEPVEU, F.; PAUL, F.; DAYDÉ, J. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soygerm. *Food Chemistry*, v. 109, p. 709–721, 2011.

INFANTE, J.; SELANI, M.M.; TOLEDO, N.M.V.; SILVEIRA-DINIZ, M.F.; ALENCAR, S.M.; SPOTO, M.H.F. Atividade antioxidante de resíduos. *Brazil Food Nutrition*, Araraquara, v. 24, n. 1, p. 87-91, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. Brasília: Anvisa, 2005. 1018p. 29-240, 2005.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (2010) Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 03 de Out de 2012.

JACQUES, A.C.; PERTUZATTI, P.B.; BARCIA, M.T.; ZAMBIAZI, R.C. Doce em massa de amora preta (*Rubus spp*): análise sensorial e de fitoquímicos, *Alimentos e Nutrição*, v. 20, n. 4, p. 625-631, out./dez., 2009.

JAY, J. **Microbiologia de Alimentos**. Editora Artmed, 6ª edição, Porto Alegre, 2005. 711 p

JAMAL, P.; IDRIS, Z.M.; ALAM, M.Z. Effects of physicochemical parameters on the production of phenolic acids from palm oil mill effluent under liquid-state fermentation by *Aspergillus niger* IBS-103ZA. *Food Chemistry*, v. 124, p. 1595–1602, 2011.

JIMENÉZ, J.P.; SERRANO, J.; TABERNO, M.; ARRANZ, S.; DÍAZ-RUBIO, M.E.; GARCÍA-DIZ, L. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition*, v. 24, p. 646–53, 2008.

- JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, v. 41, p.759–63, 2006.
- KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B.C. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. *Journal Industrial Microbiological Biotechnological*, v.23, p.173–7, 1999.
- KIM, M. I.; HAM, H. O.; O., S.D.; PARK, H. G.; CHANG, H. N.; CHOI, S.H. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*, v. 39, p. 62-68, 2009a.
- KIM, S.Y.; SON, H. S. Oh, S.H. Characteristics of Korean soybean paste (Doenjang) prepared by the fermentation of black soybeans. *Journal of Food Science and Nutrition*, v. 14, p. 134–14, 2009b.
- KIM, S.H.; KWON, T.W.; LEE,Y.S.; CHOUNG, M. G.; MOON,G. S. A major Antioxidative components and comparison antioxidative activities in black soybean. *Korean, Journal of Food Science Technology*, v. 37, p.73–77, 2005.
- KIM, M. J.; JOHN, K. M.M.; CHOI, J.N.; LEE, S.; KIM, A. J.; KIM, Y. M.; LEE, C. H.Changes in secondary metabolites of green tea during fermentation by *Aspergillus oryzae* and its effect on antioxidant potential. *Food Research International*, v. 53, p. 670–677, 2013.
- KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems- an overview. *Critical Reviews, Biotechnology*, v. 25, n.1-2, p. 1-30, 2005.
- KOTWAL, S. M.; GOTE, M. M. SAINKAR, R. S.; KHAN, I.; KHIRE, J. M. Production of -galactosidase by thermophilic unguis *Humicola* sp. in solid-state fermentation and its application in soyamilk hydrolysis. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 3, p. 337-343, 1998.
- KUMAR, D. JAIN, V.K.; SHANKER, G.; SRIVASTA,A. Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.3, p. 1725-1720. 2003.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 1390-1393, 1997.

LEE, E. S. et al. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Journal Pharmacies and Pharmacological*, v. 55, p. 1169-1174, 2006.

LEE, I.; HUNG, Y. H.; CHOU, C. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *International Journal Food Microbiology*, v. 121, p. 150-156, 2008a.

LEE, S.; BAE, H.; KIM, N.; HWANG, S. Optimization of growth conditions of *Lentinus edodes* mycelium on corn processing waste using response surface analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.163,n.3, p.161–163,2008b.

LIMA A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (caryocar brasiliense, camb.).** Tese. [Doutorado em Bromatologia] - Universidade de São Paulo; 2008.

LIYANA-PATHIRANA, C. M.; SHAHIDI, F. Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1151–1157, 2007

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, v. 68, p. 81-85, 2000.

MACIEL, D.C.G.; BRASIL, D.S.B.; ROCHA FILHO, G.N.; FARIA, L.J.G. Produção de sabonete translúcido utilizando óleos das sementes de mamão hawai (*Carica papaya*) como matéria-prima saponificável. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. Ponta Grossa. v.4, n.1, p.72-79, 2010.

MALACRIDA C.R.; ANGELO, P.M.; ANDREO, D; JORGE, N. Composição química e potencial antioxidante de extratos de sementes de melão amarelo em óleo de soja, *Revista Ciência Agronômica*, v.38, n.4, p.372-376, 2007.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2373–83, 2008.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉZY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food source and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.79, p. 727-747, 2004.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEAO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. *Química Nova*, v.35, n.3, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000300014>> Acesso em: 18 de Março de 2012.

MAKRIS, D.P; BOSKOU, G; ANDRIKOPOULOS, N.K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.20, p.125-132, 2007.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S.I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C.N.; TEIXEIRA, J.A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, v.29. p. 365–373, 2011.

MATTOS, G. Extração e quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides de *Eugenia Pyriformia* Combess usando diferentes solventes. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.34f. Disponível em:< [www.repositório,raça.ufprf.edu.br/jspui/hond/1957](http://www.repositório.raça.ufprf.edu.br/jspui/hond/1957)>. Acessado em: Out de 2013.

McCUE, P.; SHETTY, K. Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: Integration of Systems Biology and Biotechnological Approaches. *Food Biotechnology*, v. 17. p. 67-97, 2003.

MELO, E. A. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2010.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V; L.A.G.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, n. 2, 2008.

MELO, P.S.; BERGAMASHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E. ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciência Rural*, v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.

MELO, E. A.; ANDRADE, R. A. M. S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. *Alimentos e Nutrição*, v. 21, n. 3, p. 453-457, 2010.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PASTORE, G.M.; SOCCOL, C.R. Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, p.245–248, 2003.

MEDEIROS, A.B.P.; SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; WOICIENHOWSKI, A.L. **Flavor production by solid and liquid fermentation**. In Y.H.Hui (Ed.), *Hand book of food products manufacturing*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. p.193–203. 2007.

MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; GARÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruits and derivateis. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p.282-290. 2008.

MIYAOKA, M.F. **Avaliação do potencial dos fungos do gênero *Rhizopus spp* na produção de substancias bioativas com ação antioxidante utilizando diferentes susbtratos**. Dissertação (mestrado), Programa de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012, 158f.

MONTEALEGRE , R.R. PECES, R.R.; VOZMEDIANO, J. L. C.; GASCUEÑA, J.M.; ROMERO, E.G. Phenolic compounds in skins and seed of tem grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food and Analysis*, v.19. p. 687-693, 2006.

MORTON, L.; CACCETTA, R.; PUDDEY, I.; CROFT, K. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevante to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 27, n. 3, p. 152-159, 2000.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NADHLALA, A. R.; CHITINDINGU, K.; MUPURE, C.; MURENJE, T.; NADHLALA, F.; BENHURA, M. A.; MUCHUWETI, M. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Diospyros mespiliformia* (jackal Berry), *Flacourtia indica* (Batoka plum), *Uapaca kirkiana* (wild ioquat) and *Ziziphus mauritiana* (yellow Berry) fruits. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 43, n. 2, p. 284-288, 2008.

NIGAM, P.S.; Pre-treatment of agro-industrial residues. In: Nigam, P.S..*Biotechnology for agro-industrial residues utilization*. first ed. Netherlands: Springer; p.13–33, 2009.

NIGAM, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues, I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v.74, p. 69-80, 2009

NUNO, M. **A química dos sabores do vinho – os polifenóis**. Centro de Investigação em Química (CIQ). Disponível em: <  
<http://www.ragc.cesga.es/RRAGC/revista2009/quimica.html>>. Acesso em: 04 Nov de 2012.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; SILVA, C.A., HENRIQUES-BECHARA, E.J.; DE BARROS, M.P.; MANO, C.M.; FONSECA-GOULART, L. O. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues, *Food Chemistry*, v.115, n. 2, p. 469-475, 2009.

ORZUA, M.C.; MUSSATTO, S.I.; CONTREAS-ESQUIVEL, J.C.; RODRIGUEZ, R.; GARZA, H.; TEIXEIRA, J.A.; AGUILAR, C.N. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation, *Industrial Crops and Products* , v. 30. p. 24–7, 2009.

PANDEY, A; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New Developments is Solid State fermentation Bioprocess and Bioproducts. *Processing Biochemistry*, v. 35, n.10. p. 1135-1169, 2006.

PANDEY, A. Solid state fermentation. *Journal Biochemistry Enginnering*, v.13, p. 8184, 2003.

PARVATHY, K.S.; NEGI, P.S.; SRINIVAS, P. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curcumin- $\beta$ -diglucoside. *Food Chemistry*, v. 115. p. 265–271, 2009.

PELLEGRINI, N MIGLIO, C.; CHIAVARO, E.; VISCONTI, A.; FOGLIANO, V. Effects of Different Cooking Methods on Nutritional and Physicochemical Characteristics of Select Vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 139-147, 2007.

PEREIRA, B. Passaporte para exportar. Frutas e derivados. Ano 2. ed. 05. Março, 2007.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F; DIEKMANN, W; PLESHER, A; GARTZIA, I; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetables and fruit wastes, **Food Chemistry**, v. 97. p. 137–150. 2006.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Reserch International*, v.791-800, 2006.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, food, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v.41, p.274-285, 2008.

PIMENTEM-SOUZA, J.D.R.; SOUZA, D.S.; GUALBERTO, N.C.; RAMALHO, S.A.; MOREIRA, J.J.S.; NARAIN, N. Qualidade funcional da infusão do chá verde comercial, *Revsta de Nutrição*, v. 25, p. 753-763, 2012.

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

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p. 3396-3402, 2000.

RAJESH, N.; JOSEPH, I.; RAJ, R.P. Value addition of vegetable wastes by solid-state fermentation using *Aspergillus niger* for use in aquafeed industry. *Waste Management* v.30. p. 2223–2227, 2010.

RAMONI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Response from Romanin et al.: Microbial virulence results from the interaction between host and microorganism, *Trends in Microbiology*, v. 11, p. 158-159, 2003.

RANDHIR, R.; SHETTY, K.; Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative Food Science Emerging Technological*, v. 8, p.197–204, 2007.

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

RIBEIRO, A.; BRETANHA, C.; KUPSKI, L.; GIACOBBO, G.; SOUZA, M.; BADIALE-FURLONG, E. **Determinação de compostos fenólicos em biomassa de farelo de arroz fermentado.** Disponível em: <[www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/11/159912669.htm](http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/11/159912669.htm)> Acesso 19 Ago de 2013.

ROBLEDO, A.; AGUILERA-CARBÓ, A.; RODRIGUEZ, R.; MARTINEZ, J.L.; GARZA, Y.; AGUILA, C.N. Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *Journal Industrial Microbiological Biotechnological*, v. 35. p. 507–513, 2008.

ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FET, T. Influência do solvent no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tonnat* e *Ancelota*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28. p. 238-244, 2008.

ROCKENBACH I.I.; RODRIGUES, E.; CATANEO, C.; GONZAGA, L.V.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Phenolic acids and antioxidant activity of *Physalis peruviana* L. fruit. *Alimentos e Nutrição*, v. 19, n.3, p. 271-276, 2008.

ROCHA, M.S. Compostos Bioativos e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. Dissertação (Mestrado em Alimentos em Nutrição)- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011. 93f.

RODRIGUEZ-COUTO, S. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnological Journal*, v. 3. p. 859–870, 2008.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 51, p. 100-109, 2008

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de Bioprocessos para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Polpa Citríca**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. 107f

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; PÉREZ- JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SACRAMENTO, C.K.; FARIA, J.C.; CRUZ, F.L.; SOUSA, W.B.; GASPAR, J.W.; LEITE, J.B.V.L. Caracterização física e química de frutos de três tipos de graviola (*Annona muricata* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, n. 2, p. 329-331, Agosto 2003.

SANTANA, R.S.M.; GONÇALVES, Z. S.; BONOMO, R.C.F.; FRANCO, M. Produção de amiloglucosidade utilizando como substrato a palma forrageira, *Revista Caatinga*, v. 25, n. 1, p. 188-183, 2012.

SANTOS, M.M.; ROSA, A.S.; DAL'BOIT, S.; MITCHEKL, D.A.; KRIEGER, N. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes, *Bioresource Technology*, v. 93, p. 261–268, 2004.

SANTOS, D.T.; SARROUH, B.F.; SANTOS, J.C.; PÉREZ, V.H.; SILVA, S.S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia, Janus, v. 3, n.4, 2006.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pendúculo de cajú como substrato/** Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Natal, 2007.

SENHORAS, E. **Estratégia de uma Agenda para a Cadeia Agroindustrial do Coco.** Campinas: Ed. ESC, 2005

SHARMA, V.K.; CANDITELLI, M.; FORTUNA, F.; CORNACCHIA, G. Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting: Review. Energy Conversion Management, v. 38, p. 453-478, 2008.

SHI, S.Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification for ester synthesis. Bioresource Technology, v. 12, p. 100, p.2607–12, 2009.

SILVA, Q. J.; MOREIRA, A. C. C. G.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de cirigueiras. Alimentos e Nutrição, v. 23, n. 1, p. 73-80, 2012a.

SILVA, W.S. **Qualidade e atividade antioxidante em frutos de variedades de aceroleira.** 2008. 167p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

SILVA, G. K. C.; RAMALHO, S. A.; GUALBERTO, N. C.; GOMES, E. B.; R. C. M. MIRANDA; NARAIN, N. Utilização de resíduo agroindustrial como matéria prima para a produção de ácido cítrico por *Kluyveromyces marxianus* URM 4404, Scientia Plena, v.8, n. 5, 2012b.

SILVA, M. F.; FERREIRA, R. O.; SILVESTRE, R.G.; CÂMARA, C. A.; PORTO, A.L. F.; SILVA, T. M. S. **Flavonóide e atividade antioxidante da casca da mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes).** Sociedade Brasileira de Química (SBQ) Disponível em: <<http://www.cenapesq.ufrpe.br/files/T3726-1.pdf>> Acesso em: 08 de Nov 2012c

SILVA, F. M.; JONES JR, J. Reações orgânicas em meio aquoso. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 646-657, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 5ª Edição –Porto Alegre, RS; Florianópolis SC: UFSC, 2007.

SINGH, H.B.; SINGH, B.N.; SINGH, S.P.; NAUTICAL, C.S. Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soy bean seed matrix. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6444–53, 2010.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; ZOCLO, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Journal of Biochemistry Engineering*. v.8. p. 44-53, 2009.

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

SOBRINHO, R.B. **Potencial de exploração de Anonaceas no nordeste do Brasil**. Fortaleza, 2010.

SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L.P.S.; LEBEAULT, J.M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*: v.74, p. 175-178, 2000

SOCCOL, C.R.; MEDEIROS, A.B.P.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOARES,M.; PANDEY, A. Production of aroma compounds. In *Current developments in solid-state fermentation*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205–218, 2009.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205–218, 2003.

SOCCOL, C. R; PRADO, F. C; VANDENBERGHE, L. P. S; PANDEY, A. General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, p. 652-664. 2003.

SOONG, Y.-Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, v. 88, n. 3, p. 411-417, 2004.

SOUSA, V.R.S; PEREIRA, P.A.P; SORAIA, QUEIROZ, F; BORGES, S.V CARNEIRO, J.D.S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits, *Food Chemistry*, p. 381–386. 2012.

SOUZA, F.M; AQUINO, L.C.L. Potencial da farinha de sementes de mangaba para a produção de lipase de *Aspergillus niger*: Influência da temperatura e umidade no processo. *Scientia Plena*, v. 8, n. 12, 2012.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA L.M.; SILVA, M.J.; SILVA, M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais, *Ciência Agrotécnica*, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 51-57, 2006.

SOUSA, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes/Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1., 2002.

STRAPASSON, R.A. **Otimização dos variáveis do bioprocesso de fermentação no estado sólido para produção de ácido fumárico a partir de resíduos agroindustriais, utilizando redes neurais.** Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Paraná-Departamento de Tecnologia Química do Setor de Tecnologia, Curitiba, 2003.123p.

STARZYNSKA-JANISZEWSKA, A.; STODOLAK, B.; JAMRÓZ, M. Antioxidant properties of extracts from fermented and cooked seeds of Polish cultivars of *Lathyrus sativus*. *Food Chemistry*. v. 92, p. 109:285, 2008.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos, UNOPAR. *Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 4, p.263-9, 2012.

THAN, N.V.; ROMBOUTS, F. M.; NOUT, M.J.R. Effect of individual amino acids glucose on activation and germination of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores in temperature starter. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, p. 1204-1214, 2005.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 669-675, 2006.

THOMAS, J.H.; DRAKE, J.M.; PADDOCK, J.R.; CONKLIN, S.; JOHNSON, J.; SELISKAR, C.J.; HALSALL, H.B.; HEINEMAN, W.R. Characterization of ABTS at a polymer-modified electrode. *Electroanalysis*, v. 16, p. 547-555, 2004.

TREVIÑO-CUETO, B.; LUOS, M.; CONTREAS-ESQIVEL, J.C.; RODRIGUEZ, R.; AGUILERA, A.; AGUILAR, C.N. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.). *Bioresource Technology*, v. 98, p. 721–724, 2007.

TORINO, M.I.; LIMÓN, R.I.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; MAKINEN, S.; PIHLANTO, A.; VIDAL, VALVERDE, C.; FRIAS, J. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils, *Food Chemistry*, v. 136, Issue 2, p. 030–1037, 2013.

VALDUGA, E. **Bioprodução de composto voláteis e carotenóides por *Sporodiobolus salmonicolor* CBS 2636**. Tese (Doutorado)- Engenharia Química na Subárea de Biotecnologia, 2005.200p

VANDENBERGHE, L. P. S; SOCCOL, C. R; PRADO, F. C; PANDEY, A. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2/3, p. 205-218, 2003.

VATEEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, L.K. Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochemistry*, v. 39, p.1939-1946, 2008.

VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium crocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. ***Process Biochemistry***, v. 39, p. 367–79, 2003.

VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C. da S.; ESPOSITO, E.; NINOW, J. L. Protein enrichment of apple pomace and use in feed for Nile tilapia. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 152, n. 1, p. 74-87, 2009.

VENDRUSCULO, F., PITOL, L.O., KOCH, F., NINOW, J.L. Produção de proteína unicelular a partir do bagaço de maçã utilizando fermentação em estado sólido. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. v.1, p. 53-57, 2007.

VENTURA, J.; BELMARES, R.; AGUILERA-CARBO, A.; GUTIÉRREZ-SANCHEZ, G.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C.N. Fungal biodegradation of tannins from Creosote Bush (*Larrea tridentata*) and Tar Bush (*Flourensia cernua*) for gallic and ellagic acid production. *Food and Technological Biotechnology*, v.46, p.213–7, 2008.

VERMA, B.; HUCL, P.; CHINNAR, R.N. Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*, v. 116 p. 947–954, 2009.

VERONEZI, C.M; JORGE, N. Aproveitamento de sementes de abóboras (*Cucurbita* sp) como fonte alimentar. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.14, n.1, p.113-124, 2012.

VIEIRA, G.S. **Desenvolvimento e caracterização de barras de cereais com mangaba.** Monografia (Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sergipe, SE, 2007.

VIEIRA NETO, R. D. **Frutíferas potenciais para os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas.** Aracaju: Embrapa, 2002. 216 p

VIEIRA NETO, R. D. Caracterização física de frutos de uma população de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes). Revista Brasileira de Fruticultura, v.19, n.2, p.247-250, 1997.

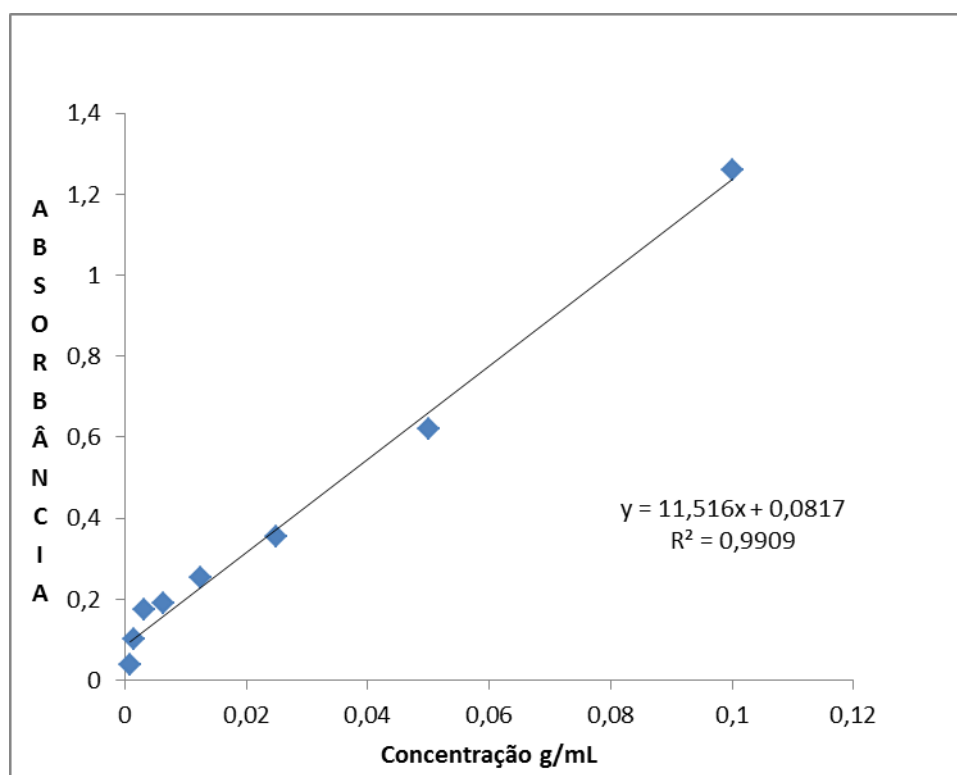
VINSON, J.A.; JANG, J.; YANG, J.; DABBAGH, Y.; LIANG, X.; SERRY, M.; PROCH, J.; CAI, S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful *in vitro* antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. Journal of Agricultural Food Chemistry, v. 47, p. 2502-2504, 2001.

ZHANG, Z.; THANG, W.; WANG, L. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries (*Myrica rubra* Sieb Zucc). Food Chemistry, v. 100. P, 845-852, 2007.

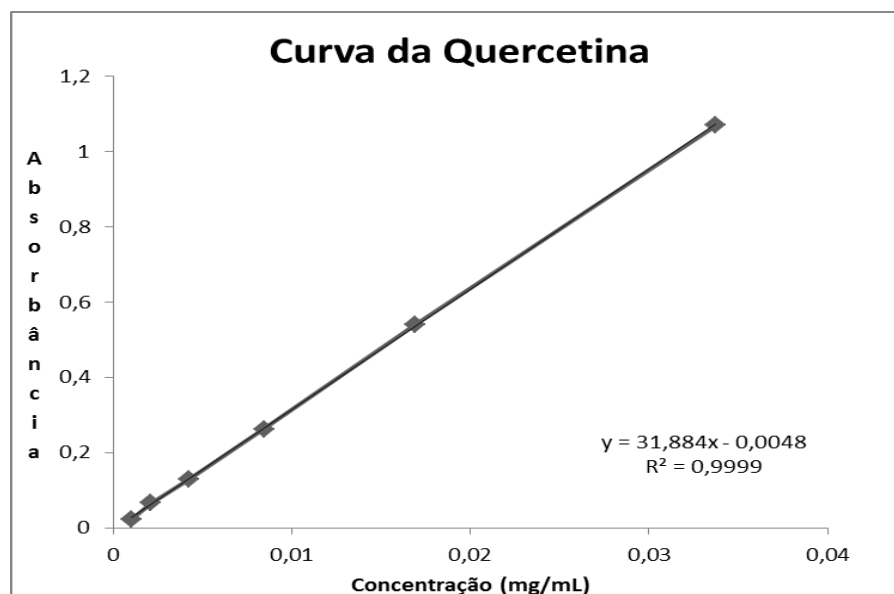
ZHANG, Z.; LEI, Z.; LU, Y.; LU, Z.; CHEN, Y. Chemical composition and bioactivity changes in stale rice after fermentation with *Cordyceps sinensis*. Journal of Bioscience Bioengineering, v. 106:188-193, 2008.

WANG, C.; SHERRARD, M.; PAGADALA, S.; WIXON, R.; SCOTT, R. A. Isoflavone content among maturity group 0 to II soybeans. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 77, p. 483-487, 2007.

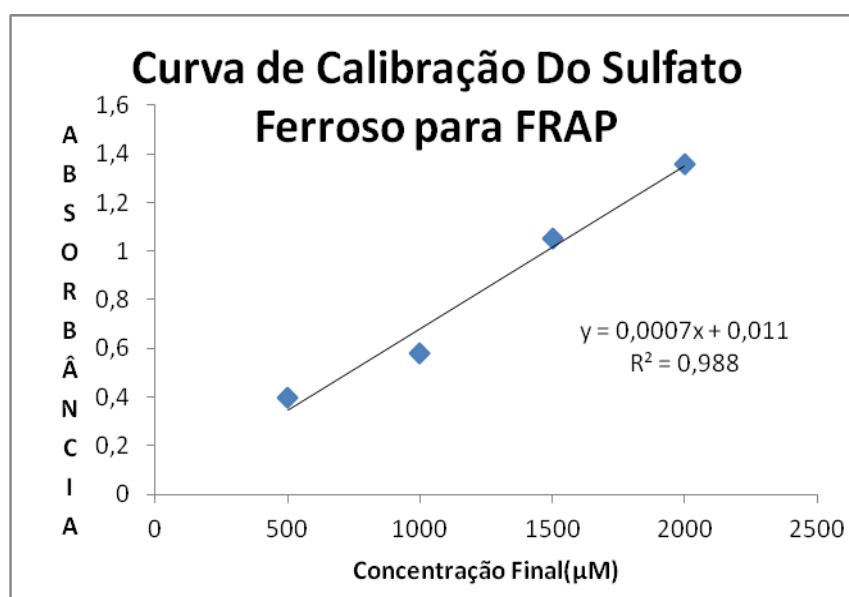
## ANEXO I



**Figura 20:** Curva de calibração de ácido gálico.

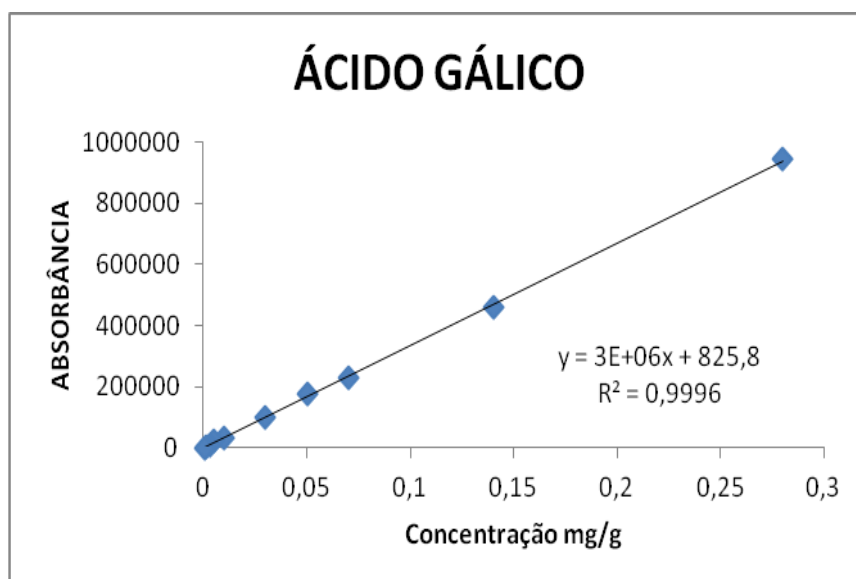


**Figura 21 :** Curva de calibração da quercetina

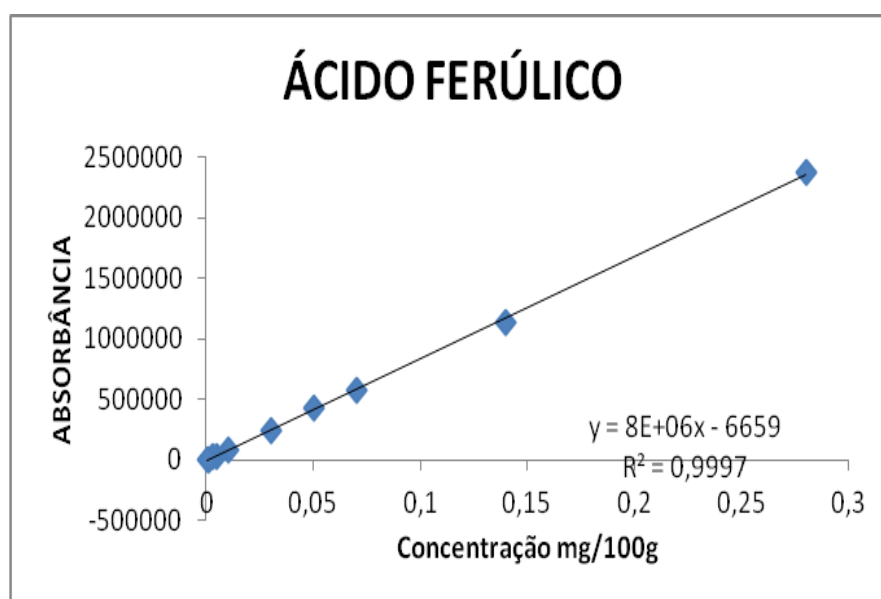


**Figura 22:** Curva de calibração do FRAP

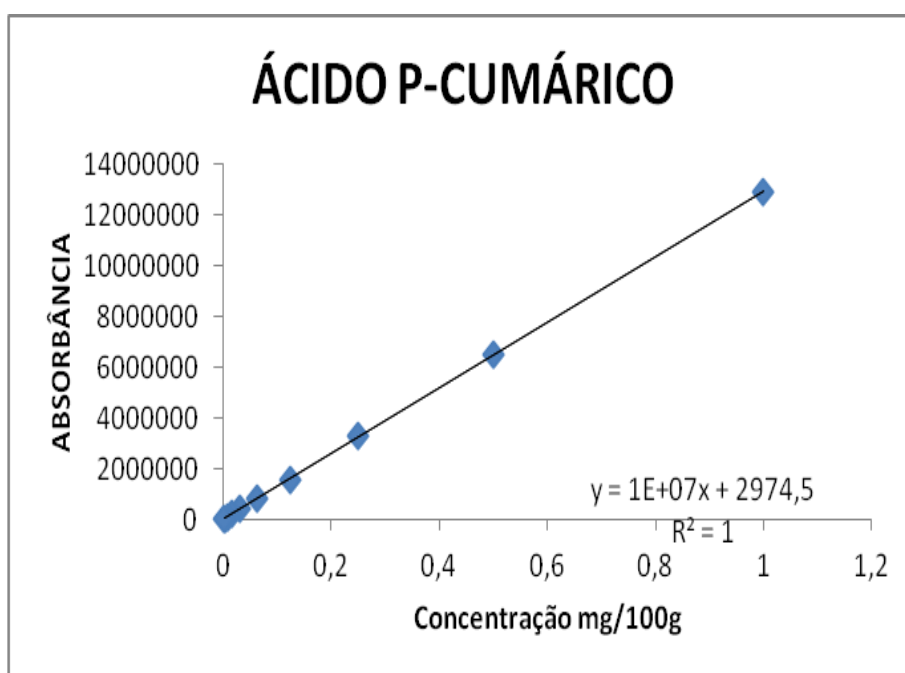
## ANEXO II



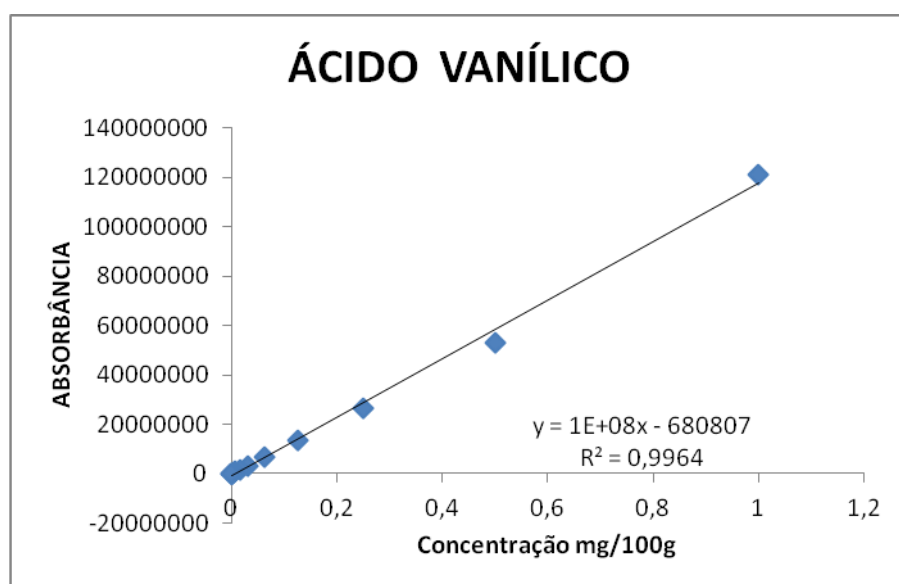
**Figura 23:** Curva de calibração do padrão ácido gálico



**Figura 24:** Curva de calibração do padrão ácido ferúlico

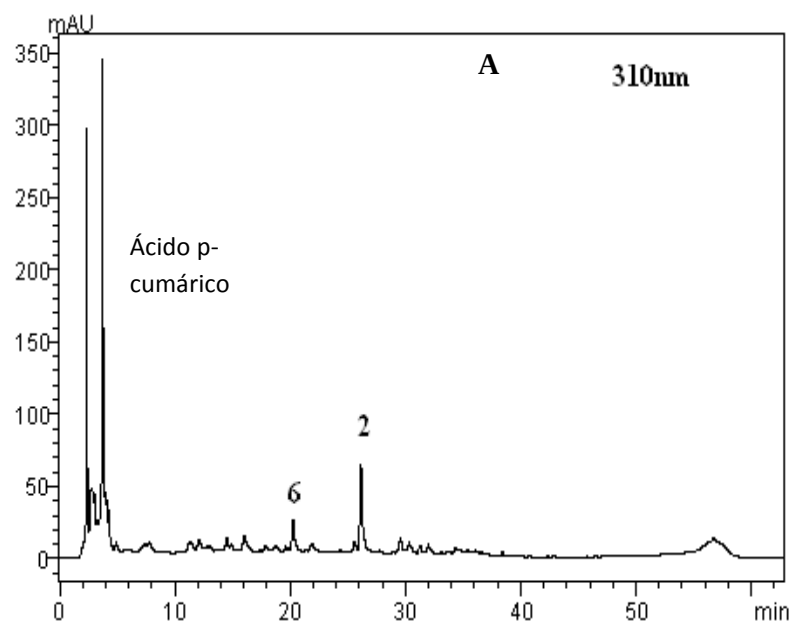


**Figura 25:** Curva de calibração do padrão p-cumárico

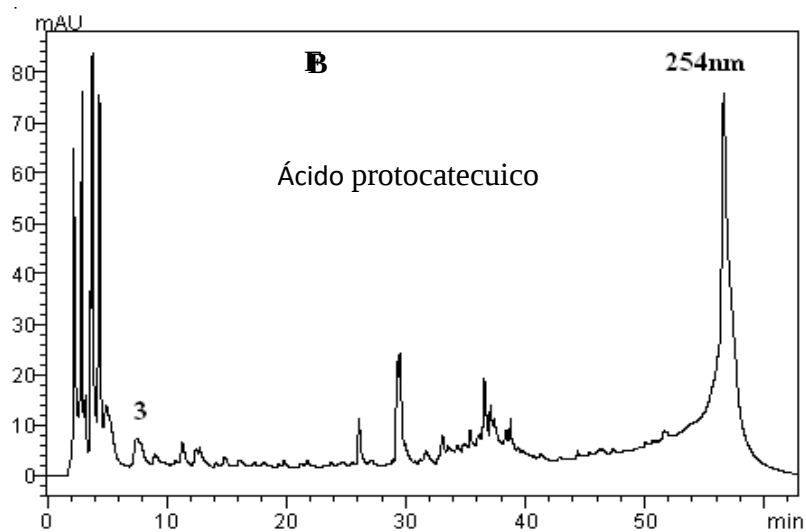


**Figura 26:** Curva de calibração do padrão ácido vanílico

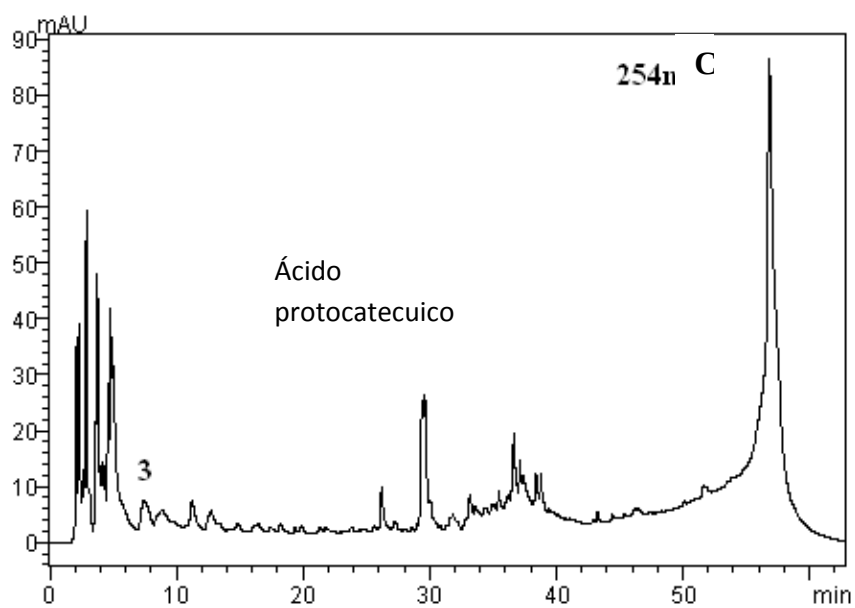
### ANEXO III



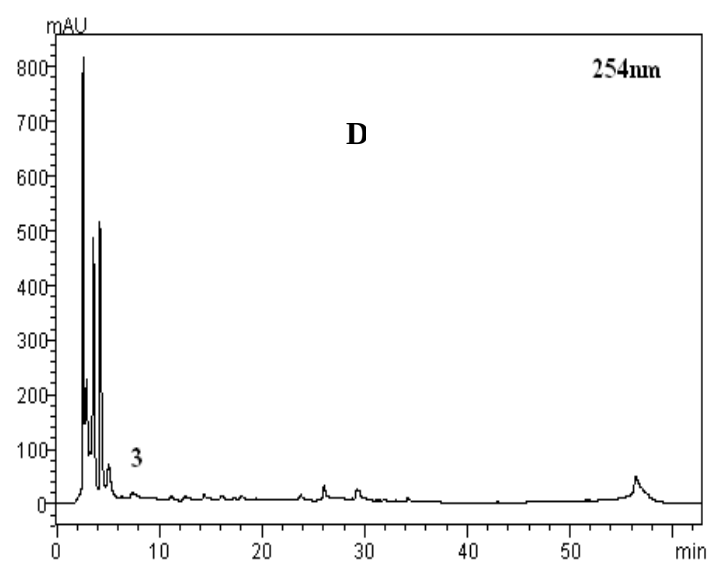
**Figura 27:** Extrato do resíduo de graviola analisado à 310 nm. (A) Picos 6 corresponde ao composto p-cumárico.



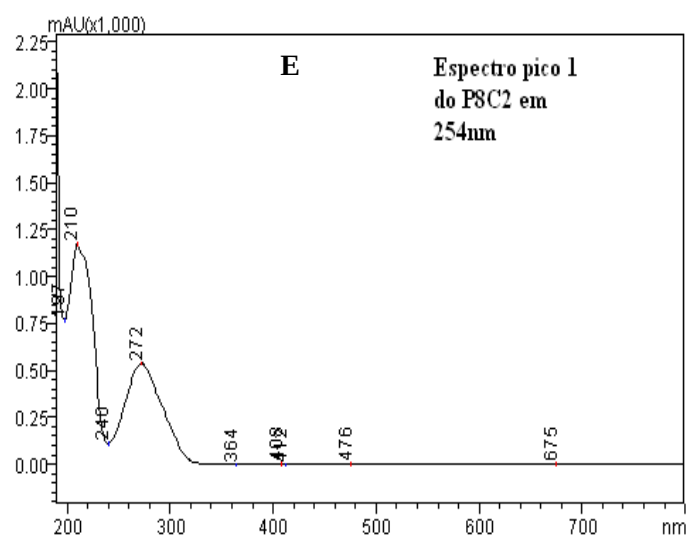
**Figura 28:** Cromatograma (B) extrato do fermentado 5. Pico 3 corresponde ao composto ácido protocatecuico obtido à 254 nm.



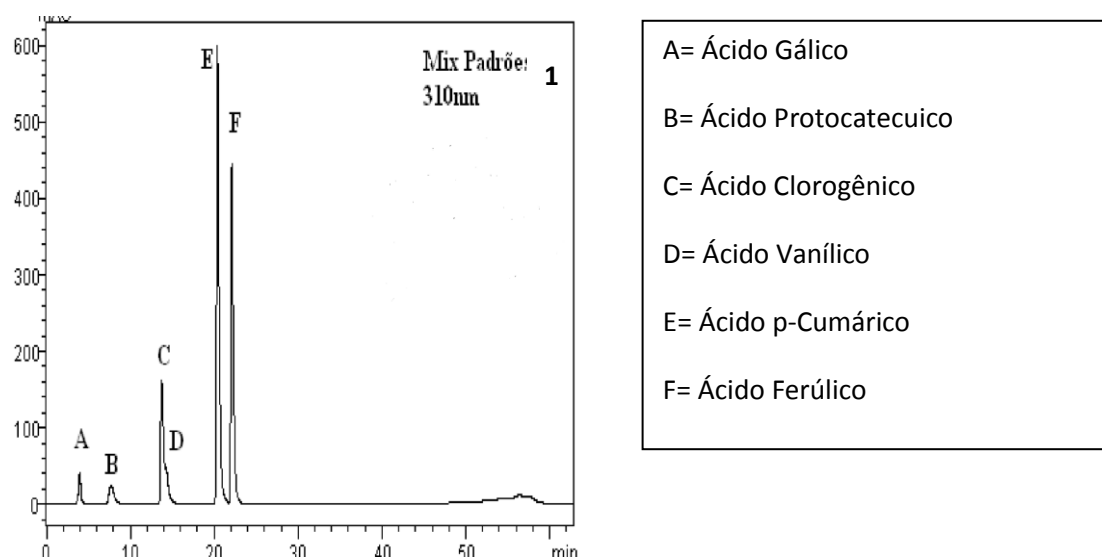
**Figura 29:** Cromatograma (C) extrato do fermentado 2. Pico 3 corresponde ao ácido protocatecuico obtido à 254 nm.



**Figura 30:** Cromatograma (D) extrato do fermentado corresponde ao ácido protocatecuico obtido à 254 nm.



**Figura 31:** Cromatograma (E) extrato do fermentado 8. Pico do composto não identificado obtido à 254 nm.



**Figura 32:** Cromatograma do Mix de padrões analisados