



ANGÉLICA CRISTINA DE SOUZA

**UTILIZAÇÃO DE CAGAITA, JABUTICABA E
PITAYA NA ELABORAÇÃO DE FERMENTADO
ALCOÓLICO E VINAGRE**

LAVRAS – MG

2015

ANGÉLICA CRISTINA DE SOUZA

**UTILIZAÇÃO DE CAGAITA, JABUTICABA E PITAYA NA
ELABORAÇÃO DE FERMENTADO ALCOÓLICO E VINAGRE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Angélica Cristina de.

Utilização de cagaita, jabuticaba e pitaya na elaboração de
fermentado alcoólico e vinagre / Angélica Cristina de Souza. – Lavras :
UFLA, 2015.

139 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Disney Ribeiro Dias.

Bibliografia.

1. Fermentação Alcoólica. 2. Fermentação acética. 3. Frutas. 4.
Imobilização celular. 5. Atividade Antioxidante. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

ANGÉLICA CRISTINA DE SOUZA

**UTILIZAÇÃO DE CAGAITA, JABUTICABA E PITAYA NA
ELABORAÇÃO DE FERMENTADO ALCOÓLICO E VINAGRE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2015.

Dra. Rosane Freitas Schwan	UFLA
Dr. Whasley Ferreira Duarte	UFLA
Dr. Cledir Rodrigues Santos	UMINHO/PT
Dr. Masaharu Ikegaki	UNIFAL

Dr. Disney Ribeiro Dias

Orientador

LAVRAS – MG

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, a oportunidade de realizar mais um sonho e por me conceder força em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Ao Instituto de Química e Tecnologia de Praga, em especial ao professor Tomás Branyik, pelo sincero acolhimento durante o período do doutorado sanduíche.

Ao professor Dr. Disney Ribeiro Dias, pela orientação, amizade, ensinamentos e por todo o apoio na realização deste trabalho.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pelos ensinamentos e confiança.

Aos professores doutores Eustáquio, Romildo, Cristina, Carla, Whasley, Patrícia e Roberta, pelos valiosos ensinamentos.

A todos os funcionários envolvidos no nosso dia a dia de trabalho. Especialmente a Rose, Ivani, Cidinha, Paulinho, Rafaela, Dona Ironдина e Du.

A Fernanda Gandra, pela contribuição nas análises de antioxidante.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Agradeço à minha querida mãe, Vera, fundamental em minha vida, pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, Thiago; cunhada, Ivy e sobrinha, Laura, minha alegria e motivação.

Aos meus tios, tias, primos e primas, que sempre estiveram ao meu lado, por todo amor e carinho.

Ao Tales, pelo carinho e atenção.

Ao querido professor de biologia Waldimir, pelo incentivo e amizade sempre.

Aos queridos amigos que estiveram comigo durante esta jornada, Alenir, Fernanda Paula Monique, Aline, Amanda Ávila, Amanda Rodrigues, Fernanda Paula, Fernanda Gandra, Iara, Kamila, Kedma, Nicele, Mariana Junqueira, Vanessa, Cíntia, Annayara, Mariana Dias, Igor, Suzana, Kelly, Karla, Andreia, Luciana, Ana Luíza, Roberta, Camila, Gabi, Bia, Maiara, Cláudia Puerari, Juliana Amorim, Daiane, Marina, Daynara e Simone.

Aos amigos que conquistei em Praga, Martina, Rafael, Paula, Luciângela, Larissa, Paulo, Airton, Cíntia e Cecília.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;
Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;
Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de saltar;
Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;
Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;
Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;
Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.”*

Eclesiastes 3:1-8

RESUMO

Bebidas fermentadas a partir de diferentes frutas estão sendo desenvolvidas como alternativa para evitar desperdícios pós-colheita, bem como proporcionar efeitos benéficos para a saúde humana, inclusive para a prevenção e o tratamento de doenças. Os objetivos, neste trabalho, foram elaborar bebidas fermentadas de diferentes frutas, cagaita (*Eugenia ysenberga*), jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) e pitaya (*Hylocereus undatus*), determinar o potencial antioxidante dos fermentados e avaliar o potencial do fermentado alcoólico de jaboticaba para a produção de vinagre com bactérias acéticas imobilizadas. Na primeira parte deste estudo, para a produção de bebidas fermentadas, utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 e as fermentações foram monitoradas diariamente, avaliando-se o número de células viáveis em suspensão, pH, grau Brix e análises cromatográficas. Ao final da fermentação, as bebidas foram analisadas quanto ao teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante *in vitro*, DPPH, FRAP e quantificação dos compostos fenólicos individuais. Os teores de etanol ao final do processo fermentativo foram de 62,26 g.L⁻¹ (7,9 °GL) no mosto de cagaita, de 67,3 g.L⁻¹ (8,5 °GL) no mosto de jaboticaba e de 75,2 g.L⁻¹ (9,5 °GL) no mosto de pitaya. Pela análise de componente principal (PCA) foi possível diferenciar os três fermentados de frutas de acordo com 25 compostos voláteis quantificados: aldeídos, álcool, álcoois superiores, terpeno, acetato, dieter, furano, ácidos graxos voláteis, cetona e etil éster. O fermentado de cagaita se destacou por apresentar maior conteúdo de fenólicos totais, capacidade de sequestrar radicais livres DPPH, além do poder redutor avaliado pelo método FRAP. Na segunda parte do trabalho foi elaborado o vinagre de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*). Para isso, primeiramente, foi realizada a fermentação alcoólica e, em seguida, a fermentação acética, para a produção de vinagre, utilizando cultura mista de bactérias acéticas imobilizadas *Acetobacter aceti* (CCT 0190) e *Gluconobacter oxydans* (CCMA 0350). O vinho obtido apresentou 74,78 g.L⁻¹ de etanol, após 168 horas de fermentação. O rendimento de ácido acético foi de 74,4% e a produtividade, de 0,29 g.L⁻¹.h⁻¹. As quantidades de ácido cítrico (6,67 g.L⁻¹), málico (7,02 g.L⁻¹) e do ácido succínico (5,60 g.L⁻¹) no vinagre foram particularmente altas. Estes ácidos orgânicos são importantes para conferir sabor e aroma ao vinagre. Os fermentados cagaita, jaboticaba e pitaya têm polifenóis e apresentaram capacidade antioxidante, sendo, portanto, fontes de substâncias bioativas. O vinagre pode ser produzido com sucesso a partir do fermentado alcoólico de jaboticaba, utilizando cultura mista de *A. aceti* e *G. oxydans* imobilizadas.

Palavras-chave: Fermentação Alcoólica. Fermentação acética. Atividade Antioxidante. Polifenóis.

ABSTRACT

Fermented beverages from different fruits are being developed as an alternative to avoid postharvest waste, as well as providing beneficial effects to human health, including the prevention and treatments of diseases. The objectives of this work, were create fermented beverages from different fruits as cagaita (*Eugenia ysenlerica*), jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and pitaya (*Hylocereus undatus*), determine the antioxidant potential of fermented and rate the fermented alcoholic jaboticaba potential for the production of vinegar with immobilized acetic bacteria. In the first stage of the study, to produce the fermented beverage was used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 and the fermentations were monitored daily, assessing the number of viable cells in suspension, ph, degree Brix and chromatographic analysis. In the end of fermentation, the drinks were analyzed for their content of phenolic compounds, antioxidant activity in vitro, DPPH, FRAP and quantitation of individual phenolic compounds. The content of ethanol at the end of the fermentation process were: 62,26 g.L⁻¹ (7,9 °GL) in cagaita juice, 67,3 g.L⁻¹ (8,5 °GL) in jaboticaba juice and 75,2 g.L⁻¹ (9,5 °GL) in pitaya juice. By principal component analysis (PCA), it was possible to differentiate the three fermented fruit according to 25 quantified volatiles: aldehydes, alcohol, higher alcohols, terpene, acetate, dieter, furan, volatile fatty acids, ketone and ethyl ester. The Cagaita fermented stood out with higher content of total phenolic ability to attract free radicals DPPH ,in addition to reducing power measured by FRAP method. In the second stage of the study, was produced the jaboticaba vinegar (*Myrciaria jaboticaba*). Firstly, alcoholic fermentation was realized, and then, acetic fermentation, to the vinegar production, using mixed culture of immobilized acetic bacteria *Acetobacter aceti* (CCT 0190) and *Gluconobacter oxydans* (CCMA 0350). The wine obtained show 74.78 g.L⁻¹ of ethanol, after 168 hours of fermentation. The yield of acetic acid was 74,4% and productivity 0,29 g.L⁻¹.h⁻¹. The amounts of citric acid (6.67 g L⁻¹), malic acid (7.02 g L⁻¹) and succinic acid (5.60 g L⁻¹) in the vinegar were particularly high. These organics acid are important to give taste and flavour to the vinegar. Fermented cagaita, jaboticaba and pitaya have presented polyphenols and show antioxidant capacity; therefore, they are sources of bioactive substances. The vinegar can be successfully produced from jaboticaba fermented alcoholic using mixed culture of *A. aceti* and *G. oxydans* immobilized.

Keywords: Alcoholic Fermentation. Acetic fermentation. Antioxidant activity. Polyphenols.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Vinho	13
2.2	Frutas como substrato no processo de fermentação	14
2.2.1	Cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i> DC)	15
2.2.2	Jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i>)	17
2.2.3	Pitaya (<i>Hylocereus undatus</i>)	18
2.3	Fermentação alcóolica	20
2.3.1	Levedura da fermentação	24
2.3.2	Compostos voláteis produzidos na fermentação alcóolica	25
2.3.3	Vinificação	28
2.4	Vinagre	29
2.4.1	Fermentação acética	31
2.4.2	Bactérias do ácido acético	33
2.4.3	Compostos presentes no vinagre	34
2.4.3	Processamento do vinagre	37
2.5	Aplicação de células imobilizadas em bioprocessos	37
2.6	Importância dos antioxidantes alimentares	40
2.6.1	Metodologias utilizadas para determinação de atividade antioxidante	43
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS	47
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	59
	ARTIGO 1 Elaboração de fermentado alcóolico das polpas de cagaita, jaboticaba e pitaya e avaliação da atividade antioxidante	59
	ARTIGO 2 Immobilised acetic acid bacteria for jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i>) vinegar production	107

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Microorganismos têm sido utilizados em diversos processos biotecnológicos para a produção de alimentos por um longo período de tempo. Atualmente, alguns alimentos fermentados são industrializados e fazem parte da dieta da população de quase todo mundo, como, por exemplo, pão, queijo, iogurte, vinagre, bebidas fermentadas (cerveja, vinho) e fermentadas/destiladas (cachaça, tequila, uísque).

Tradicionalmente, a fermentação de vinhos é proveniente do mosto de uva, matéria-prima principal desta produção. No entanto, bebidas fermentadas de outras frutas constituem produtos promissores, devido à tendência de aceitação em pesquisas de consumo. Além de contribuírem para a redução de perdas pós-colheita de frutos perecíveis, é uma tecnologia eficiente e de baixo custo, tornando-se uma das alternativas para o aproveitamento de frutos.

A transformação das frutas em bebidas fermentadas é um processo biotecnológico, no qual principalmente as leveduras utilizam os nutrientes do mosto para crescimento, com a produção vários metabólitos, convertendo um líquido açucarado numa solução de água-álcool com sabor e aroma agradável. Diversas frutas têm sido utilizadas para a produção de fermentados alcoólicos, como, por exemplo, cajá (*Spondias mombin* L.) (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003), cacau (*Thebroma cacao* L.) (DIAS et al., 2007), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*), umbu (*Spondias tuberosa* Arruda) (DUARTE et al., 2010a), lichia (*Litchi chinensis* Sonn) (ALVES et al., 2011), framboesa (*Rubus idaeus* L.) (DUARTE et al., 2010b), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) (OLIVEIRA et al., 2011), gabioba (*Campomanesia pubescens*) (DUARTE et al., 2009), banana (*Musa sapientum*) (AKUBOR et al., 2003),

acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) (SANTOS et al., 2005) e laranja (*Citrus sinensis*) (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001).

Aliados ao sabor agradável, os fermentados de frutas podem conter uma variedade de compostos antioxidantes que são importantes compostos bioativos. Recentemente, os compostos fenólicos têm atraído atenção crescente como agentes potenciais para a prevenção e o tratamento de muitas doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Além de ser uma alternativa bastante viável para a elaboração de novos produtos e agregação de valor, o consumo dessas bebidas pode representar efeitos benéficos à saúde humana.

O vinagre é um produto resultante da fermentação acética do vinho, realizada por bactérias acéticas. Este produto tem sido parte da alimentação humana desde a antiguidade, como condimento e conservante de alimentos. A grande apreciação por parte dos consumidores tem impulsionado a produção de vinagre dos mais variados substratos, como frutas, vegetais, mel, substratos ricos em amido, melaço ou caldo de cana e aguardentes, entre outros.

Vinagres de frutas, em geral, são ricos em ácidos orgânicos, aminoácidos e vitaminas. Os principais ácidos orgânicos incluem ácido acético, ácido tartárico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido cítrico e ácido málico. A composição desses vinagres depende das características inerentes de cada tipo de fruta utilizada na produção.

Bactérias do ácido acético (AAB) são amplamente utilizadas em processo de fermentação e a conversão de etanol em ácido acético para a produção de vinagre é o mais conhecido. Em escala industrial, o vinagre é produzido, principalmente, por fermentação submersa, um processo aeróbio no qual o etanol proveniente de bebidas alcoólicas é oxidado para ácido acético por ação das bactérias do ácido acético.

Neste contexto, o presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: elaborar bebidas fermentadas de diferentes frutas, cagaita (*Eugenia*

dysenterica), jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) e pitaya (*Hylocereus undatus*); determinar o potencial antioxidante dos fermentados e avaliar o potencial do fermentado alcoólico de jaboticaba para a produção de vinagre com bactérias acéticas imobilizadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vinho

A história do vinho é quase tão antiga quanto a história da civilização humana. Na Bíblia encontram-se relatos sobre esta bebida e, na mitologia grega, o vinho tinha importância, sendo descrito nos escritos de Homero e Hipócrates. Por milhares de anos, o vinho tem tido grande significado ritual em muitas das principais religiões e culturas do mundo, sendo parte importante da economia e do comércio mundiais (HUTKINS, 2006; ROSS; MORGAN; HILL, 2002).

O vinho é também um dos mais antigos de todos os produtos fermentados que têm sido comercializados, produzidos em série e estudados. Muitos dos primeiros microbiologistas e químicos se preocuparam com a produção e com a ciência do vinho. Há 150 anos, quando a própria existência dos microrganismos estava sendo discutida, Pasteur provou que eles não apenas existiam, mas que também eram responsáveis tanto pela produção quanto pela deterioração do vinho (HUTKINS, 2006).

A maioria dos vinhos é produzida em climas temperados, particularmente nas áreas próximas a oceanos ou mares. Cerca de 75% de todo vinho são produzidos nas áreas oceânicas da Europa. França, Itália e Espanha são os maiores produtores, sendo responsáveis por mais da metade dos quase 27 bilhões de litros de vinho produzidos no mundo. Participantes no mercado mundial, como Austrália, África do Sul e Chile, são responsáveis por mais de 10% da produção. Os Estados Unidos produzem mais de dois bilhões de litros por ano (JEFFERY; WILKINSON, 2014).

Embora cerca de 99% de todo o vinho produzido em todo o mundo sejam feitos de uvas, suco de outras frutas também pode ser utilizados, desde que contenham açúcares livres o bastante para proporcionar o crescimento da

levedura e para se obter uma concentração de etanol (normalmente, 12% em volume) (HUTKINS, 2006; SANDHU; JOSHI, 1995).

Segundo a Legislação Brasileira (BRASIL, 2009), bebida fermentada de fruta é aquela com graduação alcoólica de 4% a 14%, em volume a 20°C, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura. Esse fermentado pode ser adicionado de açúcares, água e outras substâncias previstas em ato administrativo complementar, para cada tipo de fruta.

2.2 Frutas como substrato no processo de fermentação

Como a uva, várias outras frutas podem ser utilizadas para a formulação de mostos que podem, posteriormente, ser submetidos à fermentação alcoólica por ação de leveduras (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003). De modo geral, as frutas contêm açúcares que podem ser utilizados por leveduras, durante o processo de fermentação.

Além da uva, estudos feitos com frutas para a produção de bebidas fermentadas têm sido realizados nas últimas décadas, usando, por exemplo, cajá (*Spondias mombin* L.) (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003), cacau (*Theobroma cacao* L.) (DIAS et al., 2007), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), umbu (*Spondias tuberosa* Arruda) (DUARTE et al., 2010a), lichia (*Litchi chinensis* Sonn) (ALVES et al., 2011), framboesa (*Rubus idaeus* L.) (DUARTE et al., 2010b), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) (OLIVEIRA et al., 2011), gabioba (*Campomanesia pubescens*) (DUARTE et al., 2009), banana (*Musa sapientum*) (AKUBOR et al., 2003), acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) (SANTOS et al., 2005) e laranja (*Citrus sinensis*) (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001).

O Brasil tem abundância de frutas exóticas, com potencial para serem utilizadas na indústria de alimentos. Para tanto, é necessário o desenvolvimento

de novos métodos para o processamento de frutas tropicais, a fim de minimizar as perdas na produção, gerar mais lucros e promover o desenvolvimento sustentável de biomas como o Cerrado e a Amazônia. Um possível uso dessas frutas é na produção de vinho (DIAS et al., 2007; DUARTE et al., 2009).

Fermentados de frutas, em geral, têm um considerável potencial econômico, devido à tendência de aceitação pelos consumidores e à redução de perdas pós-colheita de frutas perecíveis (SANDHU, JOSHI, 1995). Além disso, vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas, aminoácidos e diferentes compostos bioativos podem ser obtidos por ingestão de alimentos fermentados a partir de frutas.

2.2.1 Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC)

A cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) é uma espécie adaptada a solos relativamente pobres e a sua distribuição no cerrado é bastante abrangente, ocorrendo nos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins e Distrito Federal (SILVA, 1999).

Os frutos têm formato globoso de 3 a 4 cm de diâmetro, cor amarelo-clara, levemente ácido, epicarpo membranoso, com polpa amarela, carnosa, comestível e, geralmente, com 1 a 4 sementes. As sementes têm cerca de 1 a 1,5 cm de comprimento, coloração creme e são ovais (ALMEIDA, 1998) (Figura 1). São saborosos, ricos em vitamina C e têm grande aceitação regional. Podem ser consumidos *in natura* e sua polpa é utilizada para a fabricação de doces, geleias, sorvetes e sucos (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987).



Figura 1 Fruto maduro de cagaita

O rendimento da cagaita para a produção de polpa depende da qualidade do fruto. Com frutos de boa qualidade, pode-se obter rendimento de 72% de polpa. No consumo *in natura*, devem ser tomadas algumas precauções em relação à quantidade ingerida, pois pode ter efeito laxativo (BRITO et al., 2003). Este efeito desaparece no processamento, possibilitando o consumo de cagaita de várias formas. Vinagre e álcool podem ser produzidos a partir da fermentação dos frutos (OLGA; FONSECA, 1994).

Oliveira et al. (2011) obtiveram ótimos resultados ao elaborar uma bebida fermentada de cagaita, utilizando células livres e imobilizadas. A análise sensorial da bebida revelou boa aceitação de todas as bebidas obtidas, indicando que pode ser uma alternativa para o aproveitamento e a transformação dos frutos de cagaita, que são naturalmente produzidos no cerrado brasileiro.

As folhas são utilizadas popularmente como anticonstipantes. Sob forma de chá, essas folhas têm propriedades adstringentes (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987). Suas folhas e cascas produzem efeito antidiarreico e também são utilizadas para combater doenças cardíacas, diabetes e icterícia (FERREIRA, 1980; SILVA, 1999).

2.2.2 Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*)

As jabuticabeiras pertencem à família Myrtaceae, nativas do Brasil. São árvores que podem ser encontradas em quase todo o país, sobretudo em Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná. É uma árvore geralmente alta (até 8 m), ramos com casca e de crescimento lento. As jabuticabas ‘Sabará’ (*Myrciaria jaboticaba*) são verdes quando jovens e vermelhas posteriormente. Têm flores pequenas, brancas e bem vistosas, que surgem diretamente nos troncos. Os frutos são do tipo bagas globosas de até 3 cm de diâmetro, arredondados de cor roxo-escura, quase preto, com polpa esbranquiçada, doce, comestível e saborosa, com uma a quatro sementes (Figura 2) (DONADIO, 2009a; PEREIRA et al., 2000).



Figura 2 Fruto maduro de jabuticaba

A jabuticaba vem sendo utilizada para vários fins, tanto culinários quanto medicinais. Entre estes é mencionada a decocção da casca como remédio para a asma. Por sua semelhança com a uva, muitos produtos, como fermentado alcoólico, suco, geleia, licor e vinagre, podem ser feitos com a jabuticaba. A

jabuticaba 'Sabará' ocupa a maior área cultivada no Brasil e produz frutos classificados como bacilos globosos, com 20 a 30 mm de diâmetro e polpa macia, esbranquiçada, suculenta e de sabor subácido. Apresenta, em sua composição, vitamina C, com valores médios de 23 mg por 100 g de polpa e minerais, em que se destacam ferro, cálcio, fósforo e potássio (DONADIO, 2009a; MANGALHÃES; BARROS; FINGER, 1996).

No fruto completamente desenvolvido, os carboidratos mais abundantes na polpa são os açúcares solúveis (frutose, glicose e sacarose), o que mostra a potencialidade de seu aproveitamento industrial (BARROS; FINGER; MAGALHÃES, 1996).

Duarte et al. (2011) utilizaram jabuticaba para a produção de bebida fermentada destilada que mostrou características químicas peculiares, com cerca de 20 compostos voláteis identificados e quantificados. A análise sensorial da bebida por provadores demonstrou aprovação global do destilado.

O potencial econômico de comercialização desse fruto é grande em função de suas características sensoriais para consumo *in natura* e a jabuticabeira é uma das frutíferas que têm despertado grande interesse entre os produtores rurais, devido à sua alta produtividade, rusticidade e ao aproveitamento de seus frutos nas mais diversas formas, como na fabricação de licores, geleias e fermentados. Entretanto, o que se observa em algumas regiões tipicamente produtoras de fermentados alcoólicos de jabuticaba é a falta de conhecimento tecnológico e a precariedade nas condições de produção, podendo prejudicar a qualidade do produto final (DONADIO, 2009b).

2.2.3 Pitaya (*Hylocereus undatus*)

Com alto potencial agrônômico e econômico, a pitaya é uma cactácea pertencente ao gênero *Hylocereus*. É uma planta rústica da família Cactaceae e é

conhecida mundialmente como “dragon fruit” (fruta-do-dragão) (ARIFFIN et al., 2009).

Existem diferentes espécies de pitaya, sendo algumas comerciais e outras nativas. Atualmente, as principais espécies comerciais são a pitaya de casca vermelha (*Hylocereus undatus*) e a de casca amarela (*Selenicereus megalanthus*) (DONADIO, 2009b). A *Hylocereus undatus*, conhecida como pitaya branca, ocorre naturalmente em ambientes sombreados de florestas tropicais no México, na Índia, no Vietnã e nas Américas Central e do Sul (BARTHLOTT; HUNT, 1993; INSTITUTO NICARAGUENSE DE TECNOLOGÍA AGROPECUÁRIA - INTA, 1994).

O fruto exibe um formato globoso a elipsoide, com 10 a 12 cm de diâmetro (HERNÁNDEZ, 2000), com casca vermelha e polpa branca, que é a parte comestível do fruto, formada por massa de textura mucilaginosa, com sementes pequenas e macias, distribuídas homogeneamente, e representando de 60% a 80% do peso dos frutos maduros, e um sabor suave e refrescante (Figura 3). Dentre os açúcares presentes na polpa, destacam-se a glicose e a frutose (LE BELLEC; VAILLANT; IMBERT, 2006; PIMIENTA-BARRIOS; TOMAS-VEGA, 1993).



Figura 3 Fruto maduro de pitaya

Durante a última década, a pitaya tem se tornado objeto de estudo em muitos países, devido ao potencial como nova frutífera exótica (NERD; MIZRAHI, 1999). É uma fruta cujo óleo tem efeito laxante, eficaz no controle da gastrite e de infecções nos rins, e o fruto apresenta a captina, que é considerada um tônico cardíaco e ainda tem efeito contra dor de cabeça (DONADIO, 2009b).

Estudos demonstram que pitaya pertence ao grupo de frutíferas tropicais, consideradas promissoras para o cultivo, devido à sua aparência exótica, ao sabor doce e suave, à polpa firme e às suas propriedades nutricionais e funcionais. A pitaya é uma fruta de aceitação crescente nos mercados consumidores (LE BELLEC; VAILLANT; IMBERT, 2006).

2.3 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico em que ocorre a transformação dos açúcares presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono, por ação da levedura. Além disso, várias outras reações e transformações ocorrem no mosto, acabando por produzir uma bebida alcoólica muito aromatizada.

Este processo é a forma mais antiga da aplicação biotecnológica de um microrganismo e tem sido utilizado pelos seres humanos há milhares de anos (RODRÍGUEZ-BENCOMO; POZO-BAYÓN; MORENO-ARRIBAS, 2012). Ele envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Este processo é realizado, principalmente, por leveduras, no citoplasma, com o objetivo de produzir energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas e, ainda, para seu crescimento e reprodução, sendo o etanol tão somente um subproduto desse processo (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

O processo de fermentação é de grande importância, no qual se obtém todo o álcool industrial e ampla variedade de bebidas alcoólicas, destiladas ou não (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). É composta por reações exotérmicas que liberam 23 a 24 kcal por mol de glicose fermentado (REED; NAGODAWITHANA, 1991).

A etapa da fermentação alcoólica é a mais importante na elaboração de vinhos e bebidas fermentadas, conduzidas, principalmente, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pela alta produção e tolerância a elevadas concentrações de etanol. As leveduras fermentam a glicose, o açúcar dominante, em altas taxas, mesmo em condições anaeróbicas, e transporta a glicose para dentro da célula via difusão facilitada, por meio de um gradiente de concentração através da membrana plasmática. Após a absorção, procede-se a via glicolítica *Embden-Meyerhof* (MARIS et al., 2006).

O etanol é um composto formado a partir da via glicolítica ou *Embden-Meyerhof*. Duas reações relacionadas a essa via conduzem a produção de etanol, por meio da fermentação alcoólica. Na primeira reação, o piruvato é descarboxilado, produzindo acetaldeído e liberando CO₂. Em uma segunda reação, o acetaldeído é, então, reduzido para produzir etanol e, ao mesmo tempo, uma molécula de NADH é oxidada a NAD⁺ para cada molécula de etanol produzida (Figura 4) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). O etanol determina a viscosidade (corpo) do vinho e atua como fixador de aroma, sendo o principal componente, seguido por dióis (glicóis), álcoois superiores e ésteres (MINGORANCE-CAZORLA et al., 2003).

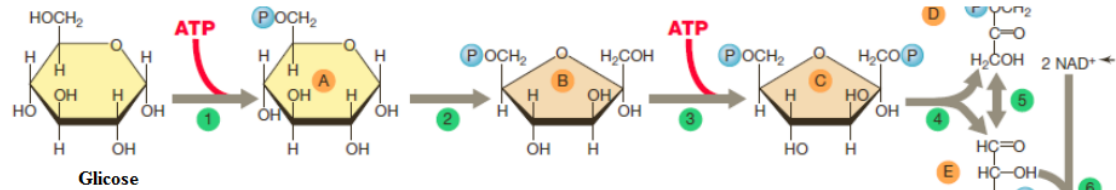
A fermentação alcoólica é considerada completa quando açúcares fermentescíveis, glicose e frutose são utilizados por completo. Para a obtenção do vinho, o processo fermentativo era, no início, conduzido em barris de madeira e ou tanques de concreto. Entretanto, atualmente, é mais indicada a

utilização de dornas de aço inox, que permitem controle da temperatura (principalmente o resfriamento) durante o processo (FLEET, 1997).

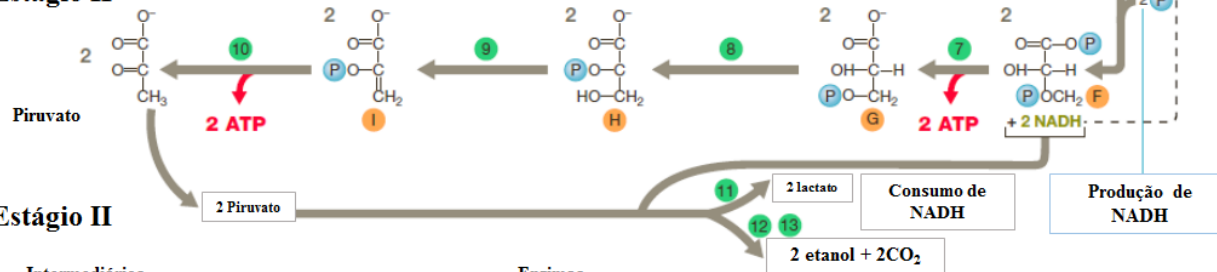
O glicerol também é produzido pela fermentação, porém, em menores concentrações. Este composto é quantitativamente o mais importante subproduto da fermentação alcoólica depois do etanol e do dióxido de carbono, e não contribui diretamente para o aroma, devido à sua natureza não volátil, mas contribui significativamente para a qualidade do vinho, proporcionando doçura, suavidade e plenitude (REMIZE; SABLAYROLLES; DEQUIN, 2000; YALCINI; OZBAS, 2008). A concentração mínima de glicerol no vinho é de 5 g.L⁻¹, mas pode atingir valores altos, em torno de 15 a 20 g.L⁻¹, dependendo das condições da fermentação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

Nesse sentido, os processos fermentativos para a produção de bebidas devem ser rigorosamente controlados, de forma que os carboidratos sejam assimilados e convertidos a etanol e/ou compostos desejáveis ao processo (WARD, 1991).

Estágio I



Estágio II



Estágio II

Intermediários		Enzimas			
A	Glicose 6-P	1	Hexoquinase	7	Fosfogliceroquinase
B	Frutose 6-P	2	Isomerase	8	Fosfogliceromutase
C	Frutose 1,6-P	3	Fosfofrutoquinase	9	Enolase
D	Diidroxiacetona-P	4	Aldolase	10	Piruvatoquinase
E	Gliceraldeído-3-P	5	Triosefosfato isomerase	11	Lactato desidrogenase
F	1,3- Bifosfoglicerato	6	Gliceraldeído-3-P desidrogenase	12	Piruvato descarboxilase
G	3-P- Glicerato			13	Álcool desidrogenase
H	2-P- Glicerato				
I	Fosfoenolpiruvato				

Figura 4 Rota Embden-Meyerhof (glicólise), seqüências de reações enzimáticas que convertem a glicose em piruvato e, em seguida, etanol, produto da fermentação
Adaptado de Madigan et al. (2014)

2.3.1 Levedura da fermentação

As leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* estão entre os mais importantes de todos os microrganismos utilizados em alimentos fermentados, sendo aplicadas na produção de cerveja, vinho e pão, produtos que têm impacto econômico em todo o mundo, da ordem dos trilhões de dólares (HUTKINS, 2006).

Diversas leveduras podem estar envolvidas na “fermentação natural ou espontânea” de vinhos. No entanto, na maioria das fermentações, culturas de leveduras iniciais são utilizadas, selecionadas com base em suas propriedades fisiológicas e bioquímicas (CAMPOS et al., 2010).

Para a seleção de leveduras é essencial estabelecer suas propriedades enológicas. Existem diferentes critérios de seleção que podem ser divididos em: favoráveis, como tolerância ao etanol, rápido início da fermentação, bom rendimento na transformação dos açúcares em etanol, capacidade de crescer em altas concentrações de açúcares e manutenção das qualidades sensoriais da bebida, e desfavoráveis, como produção de sulfeto de hidrogênio, produção de espuma e acidez volátil (CAMPOS et al., 2010; ESTEVE-ZARZOZO et al., 2000).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada como microrganismo modelo em Biologia e Genética, e sua fisiologia e propriedades bioquímicas, bem como a sequência do seu genoma, têm sido bem estudadas (HUTKINS, 2006). Esta levedura é atrativa para se trabalhar, por ser não patogênica e, devido à sua longa história de aplicação na produção de diversos produtos, foi classificada como microrganismo geralmente considerado seguro (*generally recognized as safe*, GRAS) (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

2.3.2 Compostos voláteis produzidos na fermentação alcoólica

Durante a fermentação alcoólica são formados, além do etanol e do dióxido de carbono, uma gama de metabólitos em menor quantidade, como álcoois superiores, ésteres, ácidos e acetatos, entre outros que são derivados do metabolismo do açúcar e de aminoácidos (Figura 5). Estes compostos são importantes para a formação do sabor e do aroma de bebidas alcoólicas (PLUTOWSKA; WARDENCKI, 2008; SWIEGERS et al., 2005). Os principais fatores que afetam a formação destes produtos são a espécie da levedura, o tipo de mosto e as condições de fermentação (MAURÍCIO et al., 1997).

Álcoois com mais de dois átomos de carbono são designados como álcoois superiores. A maioria desses compostos é produzida durante a fermentação e pode alcançar concentrações de 150 a 550 mg.L⁻¹ nos vinhos. Esses compostos são formados pelas leveduras a partir de açúcares ou de aminoácidos no mosto, e desempenham importante papel nas características aromáticas dos vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). Quando presentes no vinho em concentrações abaixo de 300 mg.L⁻¹, proporcionam características desejáveis às bebidas, no entanto, acima de 400 mg.L⁻¹, podem influenciar negativamente, resultando em aroma forte e sabor picante (SWIEGERS; PRETORIUS, 2005).

Os ésteres representam o grupo de compostos voláteis mais importantes produzidos durante a fermentação, contribuindo para o aroma frutado dos vinhos. Os ésteres mais significativos relacionados ao aroma frutado dos vinhos são acetato de etila (aroma frutado-solvente), acetato de isoamila (aroma de pera), acetato de isobutila (aroma de banana), etilcaprato (aroma de maçã) e 2-fenilacetato (aroma de mel, flores, frutas) (SWIEGERS et al., 2005). A formação dos ésteres ocorre durante a fermentação e eles são produzidos pela condensação de um álcool e uma acetil-coenzima-A ativada (acil-Co-A) por ação da álcool

acetil-transferase. O mais abundante éster nos vinhos é o acetato de etila (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000).

Os ácidos orgânicos em vinhos procedem da uva (tartárico, málico e cítrico) ou do processo fermentativo durante a vinificação (succínico, láctico, acético, butírico, fórmico e propiônico). Esses ácidos contribuem para a acidez, a estabilidade da cor, a conservação microbiológica, o aroma e o sabor, estando presentes em quantidades que variam de 5 a 7 g.L⁻¹, equivalente a 1%-8% em volume (JEFERY; WILKINSON, 2014).

Os ácidos graxos voláteis, com cadeia de carbono variando entre C3 e C16, são produzidos pelas leveduras durante a fermentação alcoólica e juntos podem contribuir ou afetar negativamente o aroma do vinho, dependendo do tamanho da cadeia carbonada (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). Eles são subprodutos do metabolismo dos ácidos graxos via acetil-coenzima-A (acil-Co-A), sendo sintetizados pela condensação repetitiva do acil-Co-A, catalisado pelo complexo ácido graxo sintetase (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000).

O composto carbonílico mais abundante nos vinhos é o acetaldeído, resultante da descarboxilação do piruvato pela piruvato descarboxilase com libertação de dióxido de carbono. As concentrações de acetaldeído podem variar entre 10 mg.L⁻¹ e 300 mg.L⁻¹ e um valor sensorial limiar de 100 mg.L⁻¹ (SWIEGERS; PRETORIUS, 2005). O acetaldeído em níveis baixos proporciona um agradável aroma frutado, mas elevadas concentrações contribuem negativamente no aroma, com odor irritante pungente (LIU; PILONE, 2000).

As cetonas mais importantes são acetoina (3-hidroxi-2-butanona) e diacetil (2,3-butanodiona), sendo estes compostos os responsáveis pelo aroma de manteiga nos vinhos. Cetonas como a propanona, butanona e pentanona também foram identificadas nos vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

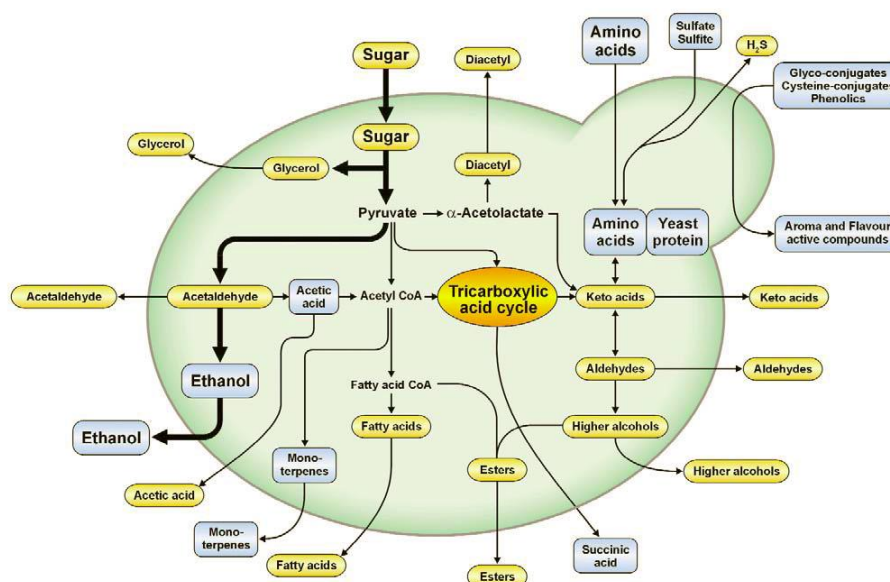


Figura 5 Representação esquemática da síntese de compostos ativos de sabor a partir do metabolismo de açúcares, aminoácidos e enxofre (SWIEGERS et al., 2005)

Duarte et al. (2010a) caracterizaram diferentes vinhos feitos de polpas de cacau, cupuaçu, gabirola, umbu e jabuticaba. Os autores concluíram que os vinhos apresentaram vários compostos que são encontrados em outros tipos de vinho, como os de uva, demonstrando que essas frutas têm potencial para serem utilizadas na produção de bebidas fermentadas. Além disso, a polpa dessas frutas pode produzir vinhos com características organolépticas aceitáveis, devido à presença de álcoois, compostos monoterpênicos e ésteres etílicos, que contribuem para a formação de aromas como os de maçã-verde, banana, doces, citros, citronela, baunilha e mel.

2.3.3 Vinificação

A vinificação é um conjunto de operações realizadas para transformar a uva ou o mosto de fruta em vinho. Existem vários processos de vinificação para cada tipo de vinho e também em função das instalações utilizadas, bem como qual destino se dará para o vinho, como por exemplo, para a produção de vinagre.

Em geral, as operações do processo de fabricação de vinho e ou bebida alcoólica fermentada são: extração e preparo do mosto, fermentação alcoólica, trasfega, clarificação, maturação e armazenamento. Em escala industrial, essas operações são aplicadas na produção do vinho, mas também podem ser empregadas para outras frutas (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001). Terminada a fermentação alcoólica, o vinho, ou o fermentado alcoólico, receberá cuidados durante a sua estocagem, a fim de conservá-lo (HASHIZUME, 2001).

Se o objetivo do fermentado alcoólico for para acetificação, devem-se levar em consideração algumas características particulares. O vinho deve estar límpido ou pouco turvo. As substâncias em suspensão podem retardar o processo de reprodução das bactérias acéticas. É recomendável acetificar vinhos secos, pois açúcares residuais podem favorecer contaminações posteriores, especialmente por leveduras. Quanto ao teor alcoólico, é interessante que o vinho apresente entre 8% v/v, embora as técnicas atuais de fermentação acética permitam utilizar vinhos com 10 % v/v a 12 % v/v de álcool. A acetificação de vinhos com graduação alcoólica muito elevada torna o processo lento e difícil (RIZZON; MENGUZZO, 2002).

2.4 Vinagre

A história da produção do vinagre remonta a cerca de 3000 a 2000 anos a.C. Provavelmente, a Pérsia foi o primeiro país produtor de um produto semelhante ao vinho que conhecemos atualmente. Os antigos egípcios faziam uso de vinagre, fato comprovado pelos resíduos encontrados em sepulturas antigas. Na Babilônia, o vinagre era utilizado como condimento e também para a preservação de alimentos; na Grécia antiga, era usado para desinfetar feridas, prevenir gangrenas e aliviar a dor causada por picadas de insetos e cobras. Imperadores romanos ordenavam que vinagre fosse adicionado à água dos legionários, a fim de torná-la potável. Além disso, nas mesas dos romanos, havia uma tigela pequena cheia de vinagre, em que se podia molhar o pão. O produto era também conhecido pelas civilizações do antigo oriente; na cozinha chinesa, o vinagre era derivado de arroz e de outros cereais e frutas (PLESSI; PAPOTTI, 2014).

A produção comercial de vinagre iniciou-se no século XVII, na França, como resultado da indústria do vinho e da cerveja. A partir daí, difundiu-se para outras regiões do mundo (MAZZA; MUROOKA, 2009).

Originalmente, o vinagre era obtido exclusivamente do vinho de uvas e da cerveja, por fermentação espontânea. No entanto, atualmente, qualquer alimento fonte de amido ou glicídios pode originar vinagre, pelo processo de dupla fermentação, alcoólica e acética, sendo necessário um processo prévio de hidrólise enzimática, quando são utilizadas fontes de amido, tais como os grãos. Cada tipo de vinagre apresenta um sabor particular, pois, no processo de fermentação acética, muitas substâncias aromáticas das matérias-primas originais são preservadas e tantas outras formadas, tornando distintos seu sabor e aroma (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001; PLESSI; PAPOTTI, 2014).

O vinagre de vinho é produzido na maioria dos países do Mediterrâneo e amplamente utilizado como condimento, acidificante e agente de conservação de alimentos. A produção tradicional requer maturação em madeira por muitos anos, para obter um elevado grau acético e o produto resultante é relativamente caro. Novas tecnologias estão sendo desenvolvidas com o objetivo de produzir vinagres com qualidade semelhante e, ao mesmo tempo, mais barato (TESFAYE et al., 2002).

Atualmente, são conhecidos três principais processos de obtenção do vinagre por conversão microbiológica do etanol presente no vinho.

No processo de oxidação de etanol a ácido acético pelo método tradicional (lento, Orléans ou fermentação em superfície), as bactérias do ácido acético (BAA) crescem abundantemente, em contato com o oxigênio, formando uma camada de células na superfície do mosto fermentado (contendo etanol) e promovem a acetificação (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001).

No processo rápido alemão (ou Boerhave), as BAA estão aderidas a um material sólido (carvão, madeira) dentro de um tanque (gerador de vinagre ou vinagreira) ao qual se adiciona o vinho a ser acetificado (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001).

Na produção industrial emprega-se a fermentação submersa, na qual culturas de BAA são inoculadas em fermentador em processo semicontínuo, para a obtenção de vinagre mais rapidamente (NATERA et al., 2003). Em inóculos com população de BAA próxima de 10^6 células/mL, o processo lento pode ocorrer em 30 dias.

2.4.1 Fermentação acética

De acordo com Plessi e Papotti (2014), a fermentação acética pode ser entendida como a transformação do álcool em ácido acético pela ação de determinadas bactérias, conferindo o gosto característico de vinagre.

A fermentação acética, resultante da oxidação de etanol por bactérias acéticas, corresponde a um processo aeróbio de fermentação biológica de dois passos; o primeiro passo no qual o etanol é oxidado a acetaldeído e, na segunda etapa, o acetaldeído é oxidado a ácido acético. Esta oxidação é catalisada por enzimas encontradas na membrana da célula, especificamente sobre a superfície externa da membrana citoplasmática em contato com o meio de cultura. Estas enzimas são álcool desidrogenas (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH), além de existirem outras importantes enzimas que atuam na oxidação do etanol (TESFAYE et al., 2002). O resultado é uma solução com uma alta concentração de ácido acético e uma pequena quantidade de etanol residual não convertido, junto com um bom número de produtos secundários (ORY; ROMERO; CANTERO, 1998).

Na Figura 6 apresenta-se um modelo simplificado de utilização do substrato etanol pelas células no processo de fermentação acética em cultivo em batelada (GÓMEZ; CANTERO, 1998).

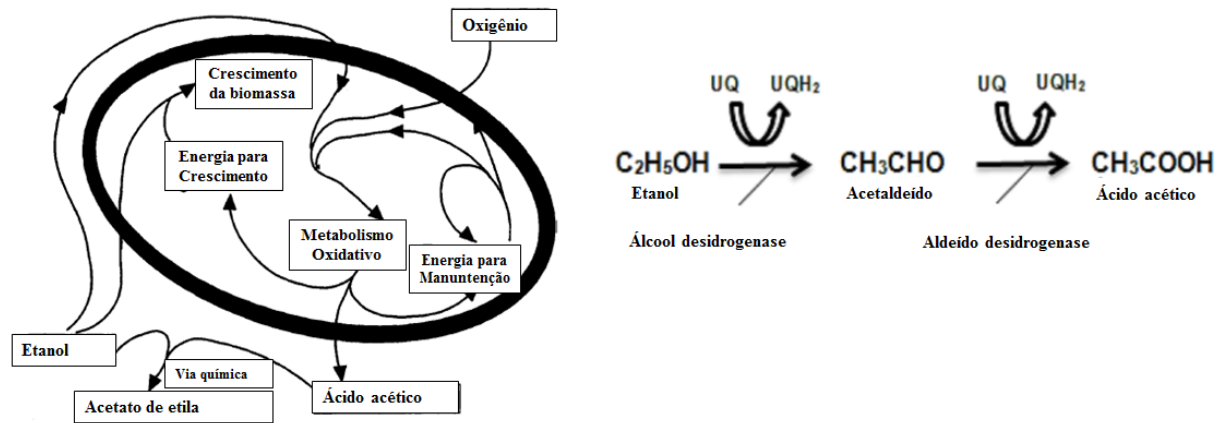


Figura 6 Modelo simplificado de utilização do substrato na célula, para o processo de fermentação acética por cultivo em batelada
Adaptado de Gómez e Cantero (1998)

Além do ácido acético, são produzidas pequenas quantidades de outros produtos, como aldeídos, cetonas, ésteres e outros ácidos orgânicos, sendo o acetaldeído o composto secundário predominante (SACHS, 1990).

2.4.2 Bactérias do ácido acético

As únicas bactérias gram-negativas utilizadas na produção de alimentos fermentados são as produtoras de ácido acético, pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconoacetobacter* (do Filo *Proteobacteria*, Família *Acetobacteraceae*). Atualmente, doze gêneros são reconhecidos e acomodados à família *Acetobacteraceae*, dos quais os mais utilizados para a produção de alimentos são *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconoacetobacter* (SENGUN; KARABIYIKLI, 2011). As bactérias do ácido acético são aeróbias, produzem ácido acético via oxidação do etanol, são mesófilas, com temperaturas de crescimento ótimas entre 25 °C a 30 °C e, embora sejam ácido-tolerantes, têm preferência por valores de pH entre 5,3 a 6,3 (HUTKINS, 2006).

A utilização de bactérias do ácido acético (BAA) tem longa história em processos fermentativos; representa campo emergente em aplicações biotecnológicas, especialmente relacionadas com a biossíntese de substâncias químicas potencialmente úteis com alto valor econômico, bem como em ciências dos alimentos, por meio de processos para a fabricação de vinagre e de outras bebidas fermentadas (GULLO; GIUDICI, 2009).

Os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* são comumente utilizados para a produção de vinagre, pois se diferenciam pela capacidade de oxidação total do etanol. As espécies pertencentes ao gênero *Acetobacter* são capazes de oxidar o etanol a ácido acético por atuação das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e acetaldeído desidrogenase (ALDH). Quando o etanol se esgota, estas bactérias podem oxidar o ácido acético à $H_2O + CO_2$ pelo ciclo do ácido tricarboxílico

(CAT). Esta última reação caracteriza a total oxidação do etanol. As espécies pertencentes ao gênero *Gluconobacter*, que também são capazes de oxidar o etanol a ácido acético por atuação das enzimas ADH e ALDH, quando o etanol se esgota, não são capazes de oxidar o ácido acético. Isso ocorre porque as espécies de *Gluconobacter* não apresentam seu CAT completo, devido à ausência das enzimas α -cetoglutarato desidrogenase e succinato desidrogenase (RASPOR; GORANOVIC, 2008).

Para suportar o processo de fabricação de vinagres, as culturas de *Acetobacter* e *Gluconobacter* devem apresentar algumas características. A cultura selecionada deve ser tolerante a altas concentrações de etanol e ácido acético, como também baixos valores de pH, níveis de aeração e requerimento nutricional. É, ainda, de fundamental importância que a cultura de BAA selecionada seja resistente ao ataque de fagos e que seja capaz de suportar temperaturas altas, próximas de 38 °C (RASPOR; GORANOVIC, 2008; SENGUN; KARABIYIKLI, 2011).

2.4.3 Compostos presentes no vinagre

Durante a fermentação alcoólica e acética ocorre a formação de compostos que irão conferir sabor e aroma ao vinagre. O aroma é um dos mais importantes indicadores qualidade e, por esta razão, a escolha de matéria-prima e as condições ótimas de acetificação são fatores fundamentais para a formação desses compostos (CALEJON et al., 2008).

Embora a maior parte dos compostos voláteis já esteja presente no vinho, o teor final está intimamente relacionado com as características genuínas do próprio vinagre (GONZÁLES; CHOZAS, 1987). O sabor de vinagre de vinho é determinado por uma série de constituintes voláteis de três origens diferentes: substrato, acetificação e, em alguns casos, envelhecimento em

madeira. Durante a acetificação, compostos voláteis provenientes do vinho podem sofrer importantes transformações (NATERA et al., 2003).

De acordo com Callejon et al. (2009), mais de setenta componentes aromáticos já foram identificados nos vinagres de vinho, incluindo ácidos, álcoois, ésteres, compostos carbonílicos, fenóis, lactonas e acetais. O aroma é, portanto, o resultado de uma combinação de várias características químicas, abrangendo uma vasta gama de polaridade, solubilidade e volatilidade.

Em relação ao teor de ácidos orgânicos, vinagres contêm ácidos voláteis (ácido acético, isovalérico, entre outros) e não voláteis (tartárico, cítrico, málico, succínico). O ácido que identifica o produto como vinagre desde o início é o ácido acético e está presente em elevadas concentrações. Seu teor pode variar, dependendo do substrato usado ou de uma possível diluição antes de sair para o mercado (NATERA et al., 2003). O vinagre para consumo deve ter entre 4% e 6% de ácido acético. A legislação brasileira estabelece em 4% o teor mínimo de ácido acético para vinagre (BRASIL, 1999).

Os álcoois mais abundantes no vinagre de vinho são o etanol e o metanol, principalmente em vinagres de vinhos (CALLEJON et al., 2008).

O teor de etanol em vinagres representa o resíduo do processo de acetificação. Segundo a legislação vigente, o limite máximo de etanol em vinagres comerciais é de 1% v/v (BRASIL, 1999). Durante o processo fermentativo, se procura o maior rendimento possível da transformação de etanol em ácido acético. Porém, o vinagre deve conter um pouco de etanol, pois, caso contrário, as bactérias acéticas, na ausência de um substrato alcoólico, podem degradar o ácido acético produzido (MORALES et al., 2001).

O metanol pode ser encontrado nos vinhos em concentrações de até 0,35 g.L⁻¹ (BRASIL, 1988). O metanol é derivado, em grande parte, de frutas e legumes frescos. Ocorre como álcool livre ou esterificado com ácidos graxos, ou, ainda, como um produto da hidrólise de grupos metoxi de polissacarídeos,

como a pectina (GONZÁLES; CHOZAS, 1987; LEE; ACREE; BUTTS, 1975). Como provém do vinho utilizado para acetificação e como não é oxidado pelas bactérias acéticas, a quantidade não se altera no processo de acetificação (RIZZON; MIELE, 2003).

Os ésteres são componentes importantes do aroma dos vinagres de vinho e são responsáveis pelos aromas frutado e floral, resultados da reação de condensação entre ácido e um álcool. Os ésteres voláteis envolvidos no aroma e são, principalmente, acetato de etila, acetato de metila e acetato de isoamila (CHARLES et al., 2000).

O acetato de etila é, quantitativamente, o éster mais importante do vinho e do vinagre de vinho. A concentração de acetato de etila depende, quase exclusivamente, do teor alcoólico e da acidez do vinagre, entre as quais existe um elevado grau de correlação. Portanto, em vinagres envelhecidos em madeira, que contêm quantidades significativas de resíduos de álcool (>1% de etanol v/v), é possível encontrar altos níveis de acetato de etila, entre 0,5 e 1g.L⁻¹, em comparação com outros vinagres (PALACIOS et al., 2002).

O principal aldeído presente nos vinagres é o acetaldeído. Este composto é metabólito intermediário de fermentação acética e não é acumulado durante a fase de atividade biológica, mas diminui por causa do metabolismo oxidativo de fermentação (PALACIOS et al., 2002).

Acetoína, produto típico da fermentação acética, aumenta em todos os ciclos conforme avança a acetificação. O teor de acetoína encontrado é bastante superior ao dos vinhos, sendo maior em vinagres tradicionais (CALLEJON et al., 2008; PALACIOS et al., 2002). Na acetificação, a quantidade de acetoína é formada pela via do ácido pirúvico e, principalmente, pela oxidação do 2,3-butanodiol presente no vinho. Por esta razão, o teor de acetoína do vinagre é mais elevado em relação ao do vinho (RIZZON; MIELES, 2003).

Os constituintes produzidos na acetificação são específicos para alguns vinagres e podem ser determinados pelas características da matéria-prima e a tecnologia de processamento. Portanto, o vinagre pode ser caracterizado e diferenciado pela quantidade e a qualidade da análise de seus compostos.

2.4.3 Processamento do vinagre

Antes de se colocar o produto para a comercialização, ele deve receber alguns tratamentos para melhorar e dar estabilidade ao produto final. Isto inclui o armazenamento após a fermentação e os processos de clarificação, filtração, envelhecimento, estabilização e envase (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001).

Após o término da fermentação, o vinagre não deve permanecer na vinagreira, pois, se isto ocorrer, as bactérias, não tendo mais álcool para metabolizar, começam a oxidar o ácido acético, enfraquecendo o vinagre. Sendo assim, o vinagre já devidamente fermentado deve ser acondicionado em recipientes apropriados e mantidos sem o contato com o ar, pois sem oxigênio as bactérias são inibidas (SACHS, 1990).

2.5 Aplicação de células imobilizadas em bioprocessos

As técnicas de imobilização de células têm se tornado cada vez mais importantes e estão sendo utilizadas com êxito em diversos processos industriais, tais como os do álcool (etanol, butanol, isopropanol), de ácidos orgânicos (málico, cítrico, láctico), de enzimas (celulase, lipase, amilase), na biotransformação de esteroides na produção de hormônios, tratamento de águas residuárias e na indústria de alimentos (cerveja, vinho) (ORY; ROMERO; CANTERO, 2004).

A imobilização de células consiste no confinamento físico delas numa região definida do espaço, com preservação de suas atividades catalíticas e que podem ser utilizadas repetida ou continuamente. Esse confinamento é conseguido por meio do contato das células com algum material, chamado de suporte. A imobilização imita o que, muitas vezes, ocorre naturalmente quando as células crescem sobre superfícies ou dentro de estruturas naturais. Muitos microrganismos têm a capacidade de aderir a diferentes tipos de superfícies na natureza (KOURKOUTAS et al., 2004).

As células imobilizadas oferecem inúmeras vantagens, como aumento da produtividade da fermentação em razão das elevadas densidades celulares normalmente obtidas, facilidade de reutilização dos biocatalisadores, aumento da estabilidade desses biocatalisadores e redução de custos operacionais (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006). Além disso, as células imobilizadas são mais resistentes a condições adversas, devido à proteção da matriz de imobilização (RUSSELL; STEWART, 1992).

No entanto, as principais desvantagens da imobilização de células utilizando-se a técnica de envolvimento são as limitações de transferência de massa impostas pela matriz de imobilização, observando-se o crescimento celular mais intenso nas regiões próximas da superfície da esfera, o que pode ocasionar a liberação de células da matriz (LACA; GARCIA; DIAZ, 2000).

Durante os últimos anos, inúmeros processos biotecnológicos foram favorecidos pelas técnicas de imobilização e, portanto, várias técnicas e matérias de suporte têm sido propostas. As técnicas podem ser divididas em quatro categorias, baseadas nos mecanismos físicos empregados: fixação ou adsorção em suporte sólido, aprisionamento em matriz porosa, agregação por meio de floculação natural ou artificial e contenção da célula atrás de barreiras (KOURKOUTAS et al., 2004).

Provavelmente, o mais antigo dos processos que faz uso das células imobilizadas teve início no século XIX, um sistema chamado de método de gotejamento para a produção de ácido acético. Na fermentação acética, o vinho/vinagre é recirculado por meio de um leito fixo formado de suporte, o qual abriga uma população de bactérias acéticas fixadas (SCOTT, 1987).

Entre os diferentes métodos de imobilização de biocatalisadores, a adsorção a superfícies e o aprisionamento dentro de géis ou materiais porosos são os métodos mais estudados para a imobilização de bactérias acéticas (ORY; ROMERO; CANTERO, 2004).

Krisch e Szajáni (1996) imobilizaram a bactéria *Acetobacter aceti* utilizando o aprisionamento em alginato de cálcio e a adsorção em esferas de celulose pré-formadas. O número de células dentro do suporte não apresentou alterações significativas em relação a mudanças de temperaturas e de pH. A produção de ácido acético foi ligeiramente aumentada devido à imobilização.

Kocher, Kalra e Phutela (2006) utilizaram o etanol proveniente da fermentação de caldo de cana para a produção de vinagre com células de *Acetobacter aceti* imobilizadas em diferentes materiais. Os suportes bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e aparas de madeira foram utilizados para o método de adsorção e alginato de cálcio para o método de aprisionamento. Os autores relataram que os suportes utilizados para imobilização por adsorção foram semelhantes na produção de ácido acético, sendo significativamente superiores a células livres e imobilizadas por alginato de cálcio.

Ory, Romero e Cantero (2004) avaliaram três diferentes materiais para a imobilização de bactérias acéticas (vidro poroso, lascas de madeira e espuma de poliuretano). Reatores com temperatura controlada e vários ciclos de fermentação semicontínua foram utilizados, com o objetivo de caracterizar e comparar as propriedades da acetificação. Dos três suportes avaliados, o melhor para imobilização de bactérias acéticas e subsequente acetificação foi a espuma

de poliuretano, que permitiu um grande número de células aderidas, além de conduzir à maior taxa de acetificação (4,74 g.L⁻¹ dia).

2.6 Importância dos antioxidantes alimentares

O processo respiratório e as diversas reações oxidativas que ocorrem nas células aeróbicas induzem à formação de radicais livres no organismo. Estes compostos, devido à sua estrutura química, são altamente reativos, agindo sob muitas moléculas biológicas do organismo, como lipídios, carboidratos, proteínas e o DNA, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento celular e a instalação de doenças degenerativas, cardiovasculares, artrite reumática e aterosclerose, entre outras (CHEUNG; CHEUNG; OOI, 2003).

O termo “antioxidante” refere-se a qualquer molécula capaz de estabilizar ou desativar os radicais livres, antes que eles ataquem as células. Os seres humanos têm sistemas antioxidantes altamente complexos (enzimáticos e não enzimáticos) que trabalham sinergicamente e em combinação uns com os outros para proteger as células e os sistemas de órgãos do corpo contra os danos dos radicais livres. Assim, os antioxidantes podem ser endógenos ou obtidos como parte da dieta ou suplementos alimentares. Alguns componentes da dieta que não neutralizam os radicais livres, mas aumentam a atividade endógena, também podem ser classificados como antioxidantes (KRINSKY, 1994; RAHMAN, 2007; VELIOGLU et al., 1998).

Os antioxidantes endógenos desempenham papel crucial na manutenção das funções celulares, na saúde e no bem-estar. No entanto, sob determinadas condições, nas quais promove o estresse oxidativo, antioxidantes endógenos podem não ser suficientes e, neste caso, antioxidantes exógenos são requeridos para manter as funções celulares ideais (RAHMAN, 2007). Nesse sentido, o

grande interesse, no estudo dos antioxidantes, é decorrente, principalmente, do efeito dos radicais livres no organismo.

Entre os agentes antioxidantes encontrados nos alimentos destacam-se compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), vitaminas (A, E, C, vitaminas do complexo B), caratenoides (beta-caroteno e licopeno) e oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio, entre outros) (RATNAM et al., 2006).

Os compostos fenólicos são os principais antioxidantes dos alimentos. Embora a atividade antioxidante dos fenólicos seja associada a diversos mecanismos, esses compostos são altamente reativos com radicais livres, sendo considerado seu principal mecanismo de ação (ROGINSKY; LISSI, 2005). Para Gülçin (2010), a capacidade de um composto fenólico de atuar como um antioxidante depende da propriedade redox dos seus grupos hidroxila presentes na sua molécula e da mobilidade de elétrons na sua estrutura química. A agilidade em roubar os radicais livres dos compostos fenólicos é muito importante, devido ao dano que esses radicais causam nos sistemas biológicos.

Os compostos fenólicos são substâncias que têm um ou mais anéis aromáticos com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais e, geralmente, são classificados como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos. Compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, proporcionam funções essenciais na reprodução e crescimento, atuam no mecanismo de defesa contra patógenos, parasitas e predadores, bem como na cor das plantas. Além das funções desempenhadas nas plantas, compostos fenólicos na dieta podem fornecer benefícios à saúde (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; LIU, 2004).

Os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos com atividade antioxidante que foram identificados em frutas, verduras e outros alimentos vegetais, apresentando-se sob muitas variações, como flavonóis (quercetina,

miricetina), flavan-3-óis (catequina, epicatequina), flavonas, flavonones (narigenina), antocianinas (malvidina) e isoflavonas (ACKER et al., 1996; HOLLMAN; ARTS, 2000).

Ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois principais grupos, ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos; as diferentes substituições no anel benzênico diferenciam cada classe e composto. Entre os ácidos hidroxibenzoicos comumente encontrados estão os ácidos gálico, protocateico, siríngico, vanílico e elágico; os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns são ácidos cafeico, cumárico, ferúlico e caftárico (LIU, 2004).

Os estilbenos são compostos não flavonóides presentes em diversas plantas, porém, as uvas e o vinho são considerados as principais fontes na dieta humana. O composto mais estudado dessa classe é o *trans*-resveratrol; a síntese desse composto na uva é realizada principalmente na casca (BURNS et al., 2002; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Alimentos de origem vegetal, como frutas, legumes e grãos, e outros tipos de alimentos e bebidas, como chá, chocolate e vinhos, representam uma rica fonte de polifenóis, como antocianinas, catequinas, flavonoides, estilbenos e muitos outros compostos fenólicos, todos potentes antioxidantes que têm propriedades biológicas que podem proteger contra diversas doenças, entre elas as doenças cardiovasculares e degenerativas. As quantidades desses compostos fenólicos variam consideravelmente em diferentes tipos de matérias-primas, fatores ambientais e técnicas de processamento (KUMAR; VARAKUMAR; REDDY, 2012; VILANO et al., 2006).

Vinhos, especialmente tintos, contêm uma grande variedade de polifenóis, como ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-cumárico), estilbenos (*trans*-resveratrol), flavonóis (quercetina, rutina, miricetina), flavan-3-óis (catequina e epicatequina), bem como polímeros, como procianidinas e antocianinas. Estes compostos são atributos de qualidade do

vinho, que contribuem para a cor e as propriedades sensoriais, o sabor e a adstringência (LESSCHAEVE; NOBLE, 2005).

O corpo humano é um sistema incompleto de defesa de antioxidante. Então, é de grande importância a ingestão dietética de antioxidantes, pois essas substâncias apresentam vários benefícios, proporcionando uma melhoria na qualidade de vida da população (RATNAM et al., 2006).

2.6.1 Metodologias utilizadas para determinação de atividade antioxidante

Com o aumento do interesse na função e na diversidade de antioxidante em alimentos, diversos métodos *in vitro* para a determinação da atividade antioxidante em alimentos, bebidas e amostras biológicas têm sido desenvolvidos (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005). Esses métodos diferem, em termos de seus princípios de ensaio e condições experimentais. Como várias características e mecanismos de reação, geralmente, estão envolvidos, nenhum ensaio vai refletir com precisão todos os antioxidantes em um sistema misto ou complexo. Assim, para elucidar completamente um perfil completo de capacidade antioxidante, diferentes tipos de ensaios são requeridos (HUANG; OU; PRIOR, 2005; LI et al., 2009; PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005).

Diversos ensaios para a determinação da atividade antioxidante já são disponíveis. Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução do metal (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, cooxidação do β -caroteno) (ARUOMA, 2003; FRANKEL; MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002), entre outros. Dentre estes métodos, ABTS, FRAP, DPPH e ORAC são alguns dos mais utilizados atualmente (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURACALIXTO, 2006).

O conteúdo de fenóis totais pode ser determinado pelo método espectrofométrico de Folin-Ciocalteu, e seu mecanismo básico é uma reação de oxirredução. Este método que utiliza o reagente de Folin-ciocalteu é extensivamente empregado para a determinação de fenólicos totais em vegetais e bebidas. Baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico fosfotungstato pelas hidroxilas fenólicas, originando óxidos azuis de tungstênio (com uma intensa absorção perto de 760 nanômetros) (MOYER et al., 2002).

O 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta e tem absorção máxima na faixa de 515-520 nm. O método está baseado na capacidade de o DPPH reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes, o mesmo recebe H⁺, sendo, então, reduzido. Pode ser facilmente detectado por espectroscopia, devido à sua intensa absorção na região visível. A capacidade da amostra de reduzir o DPPH é evidenciada pela porcentagem de DPPH restante no sistema. Então, a porcentagem de DPPH remanescente é proporcional à concentração de antioxidante, e a concentração que provoca uma diminuição na concentração de DPPH em 50% é definida como IC₅₀ (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997; PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005). A capacidade antioxidante também pode ser expressa pela “eficiência antirradical” (EA) (SANCHEZ-MORENO, 2002). O DPPH apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos e representa, portanto, um excelente método para medir a atividade antioxidante em frutas e sucos de frutas.

Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000) descrevem o método *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), ou poder antioxidante de redução do ferro, como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e

bebidas (BENZIE; STRAIN, 1999). O ensaio FRAP está baseado na capacidade dos fenóis em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} . Quando isso ocorre, na presença de 2,4,6-tripiridils-triazina (TPTZ), a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado (azul intenso) com o Fe^{2+} . Apesar de ser um método relativamente simples, também é muito utilizado (AABY; HVATTUM; SKREDE, 2004; STRATIL; KLEJDUS; KUBAN, 2006; SURVESWARAN et al., 2007).

Para quantificar com precisão e identificar os polifenóis individuais, várias técnicas cromatográficas têm sido propostas. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada com detector de arranjo de diodos (DAD) e/ou detector de espectrometria de massas (LC-MS), tem sido ferramenta analítica amplamente utilizada para a quantificação de polifenóis (PRIOR et al., 2001; TSAO, 2010).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que foi possível elaborar bebidas fermentadas de diferentes frutas, como cagaita, jabuticaba e pitaya e vinagre de jabuticaba, dentro dos parâmetros exigidos pela legislação e com características químicas diferenciadas.

Os fermentados de frutas, além de apresentarem compostos importantes para o sabor e o aroma das bebidas, têm antioxidantes comparados aos das frutas *in natura*, sendo, portanto, fonte de substâncias bioativas.

Este é o primeiro estudo do conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante dos fermentados de cagaita e pitaya e vinagre de jabuticaba com células imobilizadas.

REFERÊNCIAS

- AABY, K.; HVATTUM, E.; SKREDE, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 15, p. 4595-4603, 2004.
- ACKER, S. A. van et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.
- AKUBOR, P. I. et al. Production and quality evaluation of banana wine. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 58, n. 3, p. 1-6, 2003.
- ALMEIDA, S. P. de. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. Planaltina: EMBRAPA - CPAC, 1998. 188 p.
- ALMEIDA, S. P. de; SILVA, J. A. da; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina: EMBRAPA - CPAC, 1987. 83 p.
- ALVES, J. A. et al. Chemical, physical–chemical, and sensory characteristics of Lychee (*Litchi chinensis* Sonn) wines. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 5, p. 330-336, 2011.
- ARIFFIN, A. A. et al. Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 114, n. 2, p. 561-564, May 2009.
- ARUOMA, O. I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 9/20, p. 523-524, 2003.
- BARROS, R. S.; FINGER, F. L.; MAGALHÃES, M. M. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 66, n. 3/4, p. 209-215, Oct. 1996.
- BARTHLOTT, W.; HUNT, D. R. Cactaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer, 1993. p. 161-196.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 15-27, 1999.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BRASIL. **Decreto nº 6.871**, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei nº 8918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BRASIL. **Lei nº 7678**, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados de uva e do vinho, e de outras providências. Brasília, 1988. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=189>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 36**, de 14 de outubro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Fermentados Acéticos, conforme consta do Anexo desta Instrução Normativa. Brasília, 1999. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BRITO, M. A. et al. **Cagaita**: biologia e manejo. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2003. 79 p.

BURNS, J. et al. Plant foods and herbal sources of resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 11, p. 3337-3340, 2002.

CALLEJÓN, R. M. et al. Defining the typical aroma of Sherry vinegar: sensory and chemical approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 17, p. 8086-8095, Sept. 2008.

CALLEJÓN, R. M. et al. Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 113, n. 4, p. 1252-1259, Apr. 2009.

CAMPOS, C. R. et al. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 6, p. 1871-1879, 2010.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 60-70, 2006.

CHARLES, M. et al. Potent aroma compounds of two red wine vinegars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 1, p. 70-77, 2000.

CHEUNG, L.; CHEUNG, P. C.; OOI, V. E. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, Oxford, v. 81, n. 2, p. 249-255, 2003.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, London, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009.

DIAS, D. R. et al. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Thebroma cacao* L.) pulp. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 319-329, Mar. 2007.

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

DONADIO, L. C. Jaboticaba. In: SANTOS-SEREJO, J. A. et al. (Ed.). **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2009a. p. 95-132.

DONADIO, L. C. Pitaya. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 637-729, 2009b.

DUARTE, W. F. et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 43, n. 10, p. 1564-1572, Dec. 2010a.

DUARTE, W. F. et al. Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus L.*). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 173-182, Oct. 2010b.

DUARTE, W. F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabirola (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, Apr. 2009.

DUARTE, W. F. et al. Optimization of fermentation conditions for production of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) spirit using the response surface methodology. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 5, p. 782-790, 2011.

ESTEVE-ZARZOSO, B. et al. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedes' area (Spain). **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 5, p. 553-562, 2000.

FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 6, p. 19-23, 1980.

FLEET, G. H. Wine. In: DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Birmingham: ASM, 1997. p. 105-132.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, 2000.

GÓMEZ, J.; CANTERO, D. Kinetics of substrate consumption and product formation in closed acetic fermentation systems. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 18, n. 6, p. 439-444, 1998.

GONZÁLEZ, A. M. T.; CHOZAS, M. G. Volatile components in Andalusian vinegars. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 185, n. 2, p. 130-133, 1987.

GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: a structure-activity insight. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, London, v. 11, n. 1, p. 210-218, Jan. 2010.

- GULLO, M.; GIUDICI, P. Acetic acid bacteria taxonomy from early descriptions to molecular techniques. In: SOLIERI, L.; GIUDICI, P. (Ed.). **Vinegars of the world**. New York: Springer, 2009. p. 41-56.
- HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E. et al. (Coord.). **Biotechnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: E. Blucher, 2001. p. 21-68.
- HERNÁNDEZ, Y. D. O. **Hacia el conocimiento y la conservación de la pitahaya**. Oaxaca: IPN-SIBEJ-CONACYT-FMCN, 2000. 124 p.
- HOLLMAN, P. C. H.; ARTS, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 7, p. 1081-1093, 2000.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.
- HUTKINS, R. W. **Microbiology and technology of fermented foods**. New York: Blackwell, 2006. 473 p.
- INSTITUTO NICARAGUENSE DE TECNOLOGÍA AGROPECUÁRIA. **Guía técnica para la producción de pitahaya**. San Marcos, 1994. 52 p.
- JEFFERY, D. W.; WILKINSON, K. L. Wine. In: BAMFORT, C. W.; WARD, R. (Ed.). **The Oxford handbook of food fermentations**. Oxford: Oxford University, 2014. p. 54-147.
- KOCHER, G.; KALRA, K.; PHUTELA, R. Comparative production of sugarcane vinegar by different immobilization techniques. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 112, n. 3, p. 264-266, 2006.
- KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 4, p. 377-397, 2004.
- KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.

KRISCH, J.; SZAJÁNI, B. Effects of immobilization on biomass production and acetic acid fermentation of *Acetobacter aceti* as a function of temperature and pH. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 18, n. 4, p. 393-396, 1996.

KUMAR, Y. S.; VARAKUMAR, S.; REDDY, O. V. S. Evaluation of antioxidant and sensory properties of mango (*Mangifera indica*L.) wine. **CyTA - Journal of Food**, London, v. 10, n. 1, p. 12-20, 2012.

LACA, A.; GARCIA, L.; DIAZ, M. Analysis and description of the evolution of alginate immobilised cells systems. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 203-215, 2000.

LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma: a review. **South African Society for Enology & Viticulture**, Stellenbosch, v. 21, p. 97-129, 2000. Special issue.

LE BELLEC, F.; VAILLANT, F.; IMBERT, E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. **Fruits**, Paris, v. 61, n. 4, p. 237-250, 2006.

LEE, C.; ACREE, T.; BUTTS, R. Determination of methyl alcohol in wine by gas chromatography. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 47, n. 4, p. 747-748, 1975.

LESSCHAEVE, I.; NOBLE, A. C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 81, n. 1, p. 330S-335S, 2005.

LI, H. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, Oxford, v. 112, n. 2, p. 454-460, 2009.

LIMA, U.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Ed.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blucher, 2001. v. 3, p. 1-43.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, n. 12, p. 3479S-3485S, 2004.

LIU, S. Q.; PILONE, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 49-61, Feb. 2000.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2014. 1041 p.

MAGALHÃES, M. M.; BARROS, R. S.; FINGER, F. L. Change in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 17-22, Mar. 1996.

MARIS, A. J. A. van et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.

MAURICIO, J. C. et al. The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 75, n. 2, p. 155-160, 1997.

MAZZA, S.; MUROOKA, Y. Vinegars through the ages. In: SOLIERI, L.; GIUDICI, P. (Ed.). **Vinegars of the world**. New York: Springer, 2009. p. 17-39.

MINGORANCE-CAZORLA, L. et al. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 297-304, 2003.

MORALES, L. M. et al. Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: influence of acetification and aging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 212, n. 6, p. 676-682, 2001.

MOYER, R. A. et al. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 3, p. 519-525, 2002.

NATERA, R. et al. Chemometric studies of vinegars from different raw materials and processes of production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 11, p. 3345-3351, May 2003.

NERD, A.; MIZRAHI, Y. Effect of ripening stage on fruit quality after storage of yellow pitaya. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 99-105, Feb. 1999.

OLGA, F. M.; FONCECA, C. E. L. de. Um método rápido para estimar área foliar em mudas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica DC.*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 571-577, abr. 1994.

OLIVEIRA, M. E. S. et al. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica DC*) by both free and immobilised yeast cell fermentation. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, Aug. 2011.

ORY, I. D.; ROMERO, E. L.; CANTERO, D. Modeling the kinetics of growth of *Acetobacteraceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 189-193, Feb. 1998.

ORY, I. D.; ROMERO, L. E.; CANTERO, D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production: siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 5, p. 547-555, 2004.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.

PALACIOS, V. et al. Chemical and biochemical transformations during the industrial process of sherry vinegar aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 15, p. 4221-4225, 2002.

PALMA, A. S. A.; CARVALHO, L. F. C. P.; GAVÓGLIO, L. C. Vinagres. In: _____. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 4, p. 183-208.

PEREIRA, M. C. T. et al. Atributos físicos e químicos de frutos de oito clones de jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, p. 16-21, jul. 2000. Número especial.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, Barking, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PIMIENTA-BARRIOS, E.; TOMAS-VEGA, M. V. Caracterización de la variación en el peso y la composición química del fruto en variedades de pitayo (*Stenocereus queretaroensis* (Weber) Buxbaum). **Revista Sociedad Mexicana Cactología**, México, v. 38, n. 1, p. 82-88, 1993.

PLESSI, M.; PAPOTTI, G. Vinegar. In: BAMFORT, C. W.; WARD, R. (Ed.). **The Oxford handbook of food fermentations**. Oxford: Oxford University, 2014. p. 345-385.

PLUTOWSKA, B.; WARDENCKI, W. Application of gas chromatography olfactometry (GCeO) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages e a review. **Food Chemistry**, Oxford, v. 107, p. 449-463, 2008.

PRIOR, R. L. et al. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 3, p. 1270-1276, 2001.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, Apr. 2000.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, Arlington, v. 2, n. 2, p. 219-236, June 2007.

RASPOR, P.; GORANOVIĆ, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 28, n. 2, p. 101-124, 2008.

RATNAM, D. V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology**. 2nd ed. New York: V. N. Reinhold, 1991. 454 p.

REMIZE, F.; SABLAYROLLES, J. M.; DEQUIN, S. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 371-378, 2000.

RIBEREAU-GAYON, P. et al. **The chemistry of wine stabilization and treatments:** handbook of enology. 2nd ed. New York: Wiley, 2006a. v. 2, 451p.

RIBEREAU-GAYON, P. et al. **The microbiology of wine and vinifications:** handbook of enology. 2nd ed. New York: Wiley, 2006b. v. 1, 797 p.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Sistema de produção de vinagre.** Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2006. 10 f.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Determinação de acetoína e metanol em vinagres de vinho brasileiros. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 159-168, jan./jun. 2003.

RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J.; POZO-BAYÓN, M. A.; MORENO-ARRIBAS, V. M. Wine fermentation and production. In: HUI, Y. H. (Ed.). **Handbook of plant-based fermented food and beverage technology.** Boca Raton: CRC, 2012. p. 1-22.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Oxford, v. 92, n. 2, p. 235-254, Sept. 2005.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 3-16, 2002.

RUSSELL, I.; STEWART, G. Contribution of yeast and immobilization technology to flavor development in fermented beverages. **Food Technology**, Oxford, v. 46, n. 11, p. 146-150, 1992.

SACHS, L. G. **Tecnologia dos produtos agropecuários:** transformações de produtos vegetais. Bandeirantes: FFALM, 1990. 61 p. Apostila.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, London, v. 8, n. 3, p. 121-137, June 2002.

SANDHU, D. K.; JOSHI, V. K. Technology, quality and scope of fruit wines especially apple wines. **Indian Food Industry**, Mysore, v. 14, n. 1, p. 24-34, 1995.

SANTOS, C. S. et al. Elaboração e análise sensorial do fermentado de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, p. 47-50, mar. 2005.

SCOTT, C. D. Immobilized cells: a review of recent literature. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 9, n. 2, p. 66-72, 1987.

SENGUN, I. Y.; KARABIYIKLI, S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 5, p. 647-656, 2011.

SILVA, R. S. M. **Caracterização de sub-populações de cagaita (*Eugenia dysenterica*) da região sudeste do Estado de Goiás, Brasil**. Goiânia: UFG, 1999. 107 p.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBAN, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 3, p. 607-616, 2006.

SURVESWARAN, S. et al. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, Oxford, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

SWIEGERS, J. H. et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 11, n. 2, p. 139-173, July 2005.

SWIEGERS, J. H.; PRETORIUS, I. S. Yeast modulation of wine flavor. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 57, p. 131-175, 2005.

TESFAYE, W. et al. Winevinegar: technology, authenticity and quality evaluation. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 12-21, Jan. 2002.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, Basel, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010.

VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VILLANO, D. et al. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. **Food Chemistry**, Oxford, v. 95, n. 3, p. 394-404, 2006.

WARD, O. P. **Biotecnología de la fermentación**: principios, procesos y productos. Zaragoza: Acribia, 1991. 155 p.

YALCIN, S. K.; OZBAS, Y. Z. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 325-332, 2008.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Elaboração de fermentado alcoólico das polpas de cagaita, jabuticaba e pitaya e avaliação da atividade antioxidante

RESUMO

Atualmente, há uma busca acentuada por produtos que, além de atender às necessidades básicas, exerçam também efeitos fisiológicos benéficos à saúde da população. Bebidas fermentadas a partir de diferentes frutas estão sendo desenvolvidas, pois, assim como o vinho, contêm compostos aromáticos que contribuem para o sabor e *flavor* da bebida, além de importantes polifenóis que apresentam efeitos vantajosos à saúde. Este trabalho foi realizado com os objetivos de elaborar bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita, jabuticaba e pitaya e determinar a atividade antioxidante desses fermentados alcoólicos. A partir da polpa dos frutos, foram preparados mostos e inoculados com *Saccharomyces cerevisiae*, CCMA 0200. Todos os processos fermentativos foram conduzidos em fermentadores de vidro com capacidade de 6 L, mantidos sob as mesmas condições, a 22 °C. As fermentações foram monitoradas diariamente e avaliados o número de células viáveis em suspensão, o pH, o grau Brix e as amostras foram retiradas para análises cromatográficas. Ao final da fermentação foram analisados o teor de compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e redução do ferro (FRAP), além da quantificação dos compostos fenólicos individuais das bebidas obtidas. Os teores de etanol, ao final do processo fermentativo, foram de 62,26 g.L⁻¹ (7,9 °GL) no mosto de cagaita, 67,3 g.L⁻¹ (8,5 °GL) no mosto de jabuticaba e 75,2 g.L⁻¹ (9,5 °GL) no mosto de pitaya. Por meio da análise de componente principal (PCA) foi possível diferenciar os três fermentados de frutas de acordo com 25 compostos voláteis quantificados (aldeídos, álcool, álcoois superiores, terpeno, acetato, dieter, furano, ácidos graxos voláteis, cetona e etil ester). O fermentado de cagaita se destacou por possuir maior conteúdo de fenólicos totais, capacidade em sequestrar radicais livres DPPH, além do poder redutor avaliado pelo método FRAP. Em relação aos compostos fenólicos investigados, o ácido gálico foi o maior componente em todas as amostras, variando de 789,3 µg.L⁻¹ a 30,52 µg.L⁻¹, seguido da catequina 121,09 a 44,11 µg.L⁻¹, nos fermentados de cagaita e jabuticaba, respectivamente. Os fermentados de frutas têm polifenóis e apresentaram capacidade antioxidante, sendo, portanto, fontes de substâncias bioativas. Este é o primeiro estudo do conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante dos fermentados de cagaita, jabuticaba e pitaya.

Palavras-chave: Fermentado Alcoólico. Cagaita. Jabuticaba. Pitaya. Atividade Antioxidante. Polifenóis.

ABSTRACT

Nowadays, there is a large search for products that, besides to attend the basic needs, also exert beneficial physiological effects on population health. Fermented beverages from different fruits are being developed, as well as wine, because contains aromatic compounds that contribute to the flavor of the beverage, besides important polyphenols that have beneficial health effects. This study was realized with the object to create cagaita, jabuticaba and pitaya fermented alcoholic beverages, and determine the antioxidant activity of these alcoholic beverage. From the fruit pulp were prepared musts and inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*, CCMA 0200. All the fermentations process were conducted in glass fermenters with a capacity of 6L, maintained under the same conditions, 22°C. The fermentations were monitored daily, also, evaluated the number of viable cells in suspension, ph, degree Brix and samples were removed to be done chromatographic analysis. In the ending of fermentation were analyzed the content of phenolic compounds, antioxidant activity in vitro by free radical trapping methods 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) and iron reduction (FRAP), besides the quantitation of individual phenolic compounds in the obtained beverage. The ethanol levels, in the end of fermentation process, were 62,26 g.L⁻¹ (7,9 °GL) in cagaita juice, 67,3 g.L⁻¹ (8,5 °GL) in jabuticaba juice e 75,2 g.L⁻¹ (9,5 °GL) in pitaya juice. Through principal component analysis (PCA), it was possible to differentiate the three fermented fruit according to 25 quantified volatiles: aldehydes, alcohol, higher alcohols, terpene, acetate, dieter, furan, volatile fatty acids, ketone and ethyl ester. The Cagaita fermented stood out with higher content of total phenolic ability to attract free radicals DPPH ,in addition to reducing power measured by FRAP method. In relation to the phenolic compounds investigated, gallic acid was the major component in all samples, cagaita and jabuticaba yeast, varying between 789,3 µg.L⁻¹ to 30,52 µg.L⁻¹ followed by catechin 121,09 to 44,11 µg.L⁻¹. The fermented from fruit has polyphenols and show antioxidant capacity therefore, they are sources of bioactive substances. This is the first study of polyphenol content and antioxidant activity of cagaita, jabuticaba and pitaya yeast.

Keywords: Fermented Alcoholic. Cagaita. Jabuticaba. Pitaya. Antioxidant Activity. Polyphenols.

1 INTRODUÇÃO

Apreciado no mundo inteiro, o vinho está cada vez mais presente na mesa dos brasileiros (SANTOS et al., 2005). Tradicionalmente, os vinhos são obtidos da fermentação alcoólica dos mostos de uva, que é utilizada como matéria-prima. No entanto, diversos pesquisadores já utilizam diferentes frutas tropicais e exóticas para a produção e a caracterização de bebidas fermentadas. Para a produção desses fermentados alcoólicos são empregados os mesmos processos da fabricação do vinho de uvas, variando as frutas das quais se extraem os açúcares fermentescíveis.

Maçã (SANDHU; JOSHI, 1995), caju (TORRES NETO et al., 2006), manga (KUMAR; VARAKUMAR; REDDY, 2012; REDDY; REDDY, 2005), laranja (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001), banana (AKUBOR et al., 2003), jabuticaba (ASQUIERI; SILVA; CÂNDIDO, 2004; DUARTE et al., 2010a, 2011), cagaita (OLIVEIRA et al., 2011), acerola (SANTOS et al., 2005), cajá (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003), cupuaçu (DUARTE et al., 2010a) e cacau (DIAS et al., 2007; DUARTE et al., 2010a) são alguns exemplos de fermentados de frutas já estudados.

A cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) é um fruto que tem distribuição bastante abrangente no cerrado. É saboroso, rico em vitamina C e tem grande aceitação regional. Pode ser consumida *in natura* e sua polpa é utilizada para a fabricação de doces, geleias, sorvetes, sucos e fermentados (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987; OLIVEIRA et al., 2011).

As jabuticabeiras são árvores que podem ser encontradas em quase todo o país. Os frutos são do tipo bagas globosas doces, comestíveis, com uma a quatro sementes. A jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) vem sendo utilizada para vários fins, tanto culinários como medicinais. Por sua semelhança com a uva, muitos produtos, como fermentado alcoólico, suco, geleia, licor e vinagre,

podem ser feitos com a jabuticaba (DONADIO, 2009; MAGALHÃES; BARROS; FINGER, 1996; PEREIRA et al., 2000).

A pitaya é uma cactácea pertencente ao gênero *Hylocereus*, nativa do México, América Central e América do Sul. Durante a última década, essa fruta tem se tornado objeto de estudo em muitos países, devido ao potencial como nova frutífera exótica. O seu consumo pode ser como fruta fresca, suco, polpa, sorvete ou mousse, ou como corante de doces (ARIFFIN et al., 2009; NERD; MIZRAHI, 1997).

Segundo a legislação vigente, fermentado de fruta é a bebida com graduação alcoólica de 4% a 14% em volume, a 20 °C, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura. Fermentados que não são provenientes da uva devem, obrigatoriamente, ser rotulados com a denominação fermentado, acompanhado do nome da fruta da qual se originou, como, por exemplo, fermentado de abacaxi, fermentado de laranja, fermentado de caju, entre outros, com sabores característicos de cada fruta (BRASIL, 2008).

Aliados ao sabor agradável, os vinhos de frutas podem conter uma variedade de compostos antioxidantes que são importantes compostos bioativos. A produção de fermentados de frutas que apresentem compostos fenólicos pode ser interessante, pois há muitas evidências epidemiológicas de que dietas ricas em frutas e vegetais apresentam efeitos vantajosos para a saúde (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009), como auxílio na prevenção de doenças cardiovasculares (NESS; POWLES, 1997; STOCLET et al., 2004) e cancerígenas (KATSUBE et al., 2003; WANG; MAZZA, 2002), diabetes e mal de Alzheimer (ABDILLE et al., 2005; HERTOOG et al., 1997; ISHIGE et al., 2001). Esses efeitos protetores são devido às suas propriedades antioxidantes, que resultam na diminuição de radicais livres nas células (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

O Brasil, atualmente, é o terceiro maior produtor mundial de frutas (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF, 2014), mas, devido a problemas de processamento na pós-colheita, a maior parte destas frutas é desperdiçada. Acredita-se que a industrialização seria uma das formas de diminuir o prejuízo, permitindo, assim, o aproveitamento dos excedentes, trazendo uma contribuição para melhorar a utilização desses alimentos durante todo o ano.

Portanto, a elaboração de bebidas fermentadas é alternativa viável e, além de agregar valor às frutas, por evitar o desperdício, o consumo desses fermentados pode proporcionar efeitos benéficos para a saúde humana, inclusive para a prevenção e o tratamento de doenças.

Visando um melhor aproveitamento das frutas cagaita, jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) e pitaya, objetivou-se, no presente trabalho, elaborar bebidas fermentadas e caracterizá-las quimicamente, com base na quantificação de compostos voláteis e na determinação do potencial antioxidante. Este é o primeiro estudo do conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante dos fermentados de frutas tropicais e exóticas cagaita, jaboticaba e pitaya.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção da polpa

Foram selecionados, para o preparo da polpa, somente frutos maduros de cagaita, jabuticaba e pitaya com bom aspecto, sem injúria física, podridão ou contaminação visível. Após a seleção, os frutos foram lavados em água clorada, a 5 ppm, para eliminar possíveis microrganismos existentes, e enxaguados em água corrente.

A polpa foi obtida por meio do despulpamento manual, seguido de passagem em peneira, para a remoção das sementes, e coada. Em seguida, a polpa obtida foi armazenada em sacos plásticos e congelada sem aditivo químico, segundo a metodologia proposta por Dias et al. (2007) (Figura 1).



Figura 1 Obtenção das polpas de cagaita (A), jabuticaba (B) e pitaya (C)

2.1 Elaboração dos fermentados alcoólicos de cagaita, jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) e pitaya

Os mesmos procedimentos experimentais foram utilizados para todas as frutas avaliadas neste estudo.

2.1.1 Preparo do mosto

Para o preparo do mosto, as polpas foram descongeladas, por 24 horas, à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Os mostos de cagaita, jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) e pitaya foram preparados de acordo com as metodologias propostas por Dias et al. (2007) e Dias, Schwan e Lima (2003) com modificações. Os mostos foram transferidos para fermentadores de vidro com capacidade de 6 L, 1,7 L de mosto de cagaita, 1,8 L de mosto de pitaya e 3 litros de mosto de jaboticaba. O grau Brix foi aferido por meio de um refratômetro (SP Labor, faixa de medição 0,0 a 53,0% Brix, modelo PAL-1-ATAGO). A chaptalização do mosto foi realizada para obter uma bebida cujo teor alcoólico estivesse entre 8 °GL e 10°GL.

2.1.1.1 Chaptalização

A chaptalização ocorreu a partir do grau Brix inicial das polpas. Foi utilizada sacarose comercial (açúcar cristal) para o preparo da solução. Em geral, a cada 18 g de sacarose adicionados a um volume final de 1 L eleva-se o °Brix do mosto em, aproximadamente, uma unidade. As polpas das frutas foram corrigidas com solução de sacarose, na proporção de um volume de polpa para um volume de solução de sacarose, ao valor de 16° Brix para polpas de cagaita e jaboticaba e 18,4 para polpa de pitaya.

2.1.1.2 Sulfitagem

Ao mosto foi adicionado metabissulfito de potássio na concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, proporção necessária para assegurar uma assepsia e reduzir a carga bacteriana sem afetar a atividade fermentativa das leveduras (DIAS et al., 2007).

2.1.2 Inoculação

O inóculo para as fermentações alcoólicas utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 liofilizada, obtida a partir do fornecedor LNF (Latinoamericana, Bento Gonçalves, RS, Brasil). Visando atingir uma população celular de 10^7 células/mL, utilizaram-se 6 g de levedura. A cultura foi reidratada em 60 mL de água destilada estéril, a $38 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 minutos. A fim de aumentar a biomassa, a levedura foi transferida para 200 mL de meio YEPG (em g.L^{-1} ; extrato de levedura, 10,0; peptona bacteriológica, 20,0; glicose, 20,0) e incubada, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 100 rpm, em agitador orbital (*shaker*), por 24 horas. Em seguida, a levedura foi centrifugada duas vezes e lavada em água destilada. Após as lavagens, utilizou-se o mosto para ressuspender as células e procedeu-se à inoculação a uma população inicial de 10^7 células.mL⁻¹.

2.1.3 Fermentação alcoólica

Os processo fermentativos foram conduzidos em fermentadores de vidro com capacidade de 6 L (Figura 2), mantidos à temperatura de $22 \text{ }^\circ\text{C}$. A cada 24 horas, monitoravam-se pH, sólidos solúveis totais (°Brix) e células viáveis em suspensão. Amostras foram coletadas e congeladas para, posteriormente, serem submetidas a análises cromatográficas. O encerramento da fermentação foi

considerado quando houve a estabilização do consumo de açúcares, que é medido pelo °Brix.

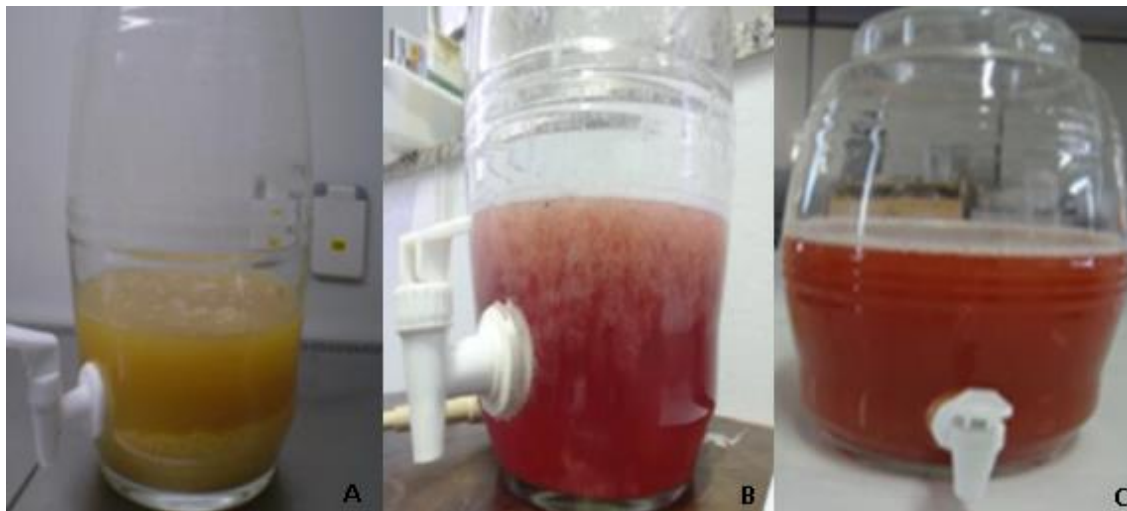


Figura 2 Fermentadores de vidro com mosto de cagaita (A), pitaya (B) e jabuticaba (C), mantidos a 22 °C

2.2 Análises realizadas durante a fermentação

2.2.1 pH

A mensuração do pH foi feita diretamente nos fermentados alcoólicos, empregando-se pHmetro digital com eletrodo de vidro, conforme as recomendações da Association Of Official Analytical Chemisty - AOAC (2000).

2.2.2 Sólidos solúveis totais (SST)

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado por leitura direta em refratômetro digital, previamente calibrado com água destilada. Os resultados foram expressos em °Brix, de acordo com a técnica da AOAC (2000).

2.2.3 Células viáveis em suspensão

Na determinação de células viáveis em suspensão no mosto em fermentação foi utilizada a técnica de contagem do número de células viáveis em Câmara de Neubauer com coloração de azul de metileno.

2.3 Obtenção da bebida

Após a estabilização do °Brix, os vinhos foram transferidos para recipientes limpos, eliminando o excesso da borra formada. As bebidas foram filtradas sob vácuo em frasco tipo Kitassato, ao qual foi acoplado um funil tipo Buchner, utilizando filtro de celulose. Terminada a filtração, as bebidas foram acondicionadas em garrafas de vidro âmbar, com capacidade para 750 mL e armazenadas sob refrigeração, a 4 °C.

2. 4 Análises cromatográficas

2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras coletadas a cada 24 horas dos processos fermentativos foram submetidas a análises cromatográficas para a determinação dos seguintes compostos: álcoois (etanol, metanol e glicerol), carboidratos (sacarose, glicose e frutose) e ácidos orgânicos (acético, láctico, málico, succínico, cítrico e tartárico).

Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corporation Japão), equipado com detectores de índice de refração (modelo RID-10A) e de ultravioleta (modelo SPD-10Ai). A coluna utilizada foi o modelo Shimpack SCR-101H (Shimadzu). Carboidratos e álcoois foram detectados pelo detector de índice de refração e a coluna à temperatura 30 °C. A determinação dos ácidos orgânicos foi realizada pelo detector de ultravioleta, com comprimento de onda selecionado em 210 nm e a coluna foi operada à temperatura de 50 °C. A fase móvel foi o ácido perclórico na concentração 100 mM, com pH ajustado para 2,1, a um fluxo de referência de 0,6 mL.min⁻¹. A quantificação foi realizada a partir da comparação com curvas de calibração, determinadas utilizando-se padrões certificados da marca Supelco. As análises foram realizadas segunda a metodologia de Duarte et al. (2009).

2.4.2 Cromatografia gasosa (CG)

Compostos voláteis no tempo final de fermentação foram analisados diretamente, sem qualquer tratamento prévio, de acordo com a metodologia de Duarte et al. (2010c). A análise foi realizada utilizando-se um cromatógrafo em fase gasosa (CG) modelo Shimadzu 17A, equipado com um detector de ionização de chama (DIC) e utilizando uma coluna capilar de sílica DB Wax (30

m × 0,25 mm i.d. × 0,25 µm) (J&W Scientific, Folsom, Calif., U.S.A.). As condições de operação foram as seguintes: temperatura do forno mantida a 50 °C, durante 5 minutos, aumentando-se para 190 °C, por incrementos de 3 °C min⁻¹ e, depois, mantida a 190 °C, durante 10 minutos. As temperaturas de injector e de detector foram mantidas a 240 °C e o gás de arraste (N₂) foi mantido a uma taxa de fluxo de 1,2 mL.min⁻¹. Injeções de 1 µL foram feitas no modo split (1:10). A identificação de compostos voláteis foi feita por comparação dos tempos de retenção das amostras com os dos compostos padrões injetados nas mesmas condições acima mencionadas. A quantificação dos compostos voláteis foi expressa como 4-nonanol (125 mg.L⁻¹) padrão interno.

2. 5 Parâmetros cinéticos das fermentações

O desempenho das fermentações foi medido pela conversão de fatores utilizando o cálculo da conversão de substrato (g.g⁻¹) em etanol (Y_{p/s}), glicerol (Y_{g/s}), produtividade volumétrica de etanol (Q_p) e eficiência de conversão (E_f) (DUARTE et al., 2010b).

As equações utilizadas foram as seguintes:

$$[Y_{p/s} = (P_f - P_i) / (S_i - S_f)];$$

$$[Y_{g/s} = (g_f - g_i) / (S_i - S_f)];$$

$$[Q_p = (P_f - P_i) / t_f];$$

$$[E_f = (Y_{p/s} / 0,51) \times 100];$$

em que P_i = concentração inicial de etanol, P_f = concentração final de etanol, S_i = concentração inicial de substrato e S_f = concentração final de substrato, g_i = concentração de glicerol inicial, g_f = concentração de glicerol final e t_f = tempo final da fermentação.

2.6 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos foi realizada pelo método proposto por Waterhouse (2001), empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul.

Alíquotas de 0,5 mL de cada amostra foram adicionadas aos tubos contendo 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10%. Após 8 minutos, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio a 4%. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos foi medida espectrofotometricamente, na faixa de absorção de 750 nm. O cálculo do teor de fenólicos foi realizado a partir da equação da reta obtida da curva padrão do ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro da amostra (mg.Eq ácido gálico.L⁻¹).

2.6 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante dos vinhos de cagaita, jabuticaba e pitaya foi avaliada por meio de dois métodos *in vitro*: determinação da capacidade de sequestrar radical livre (DPPH) e método de redução do ferro (FRAP).

2.6.1 Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH

A capacidade sequestrante de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) foi analisada conforme a metodologia descrita pela Rufino et al. (2007). Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH, que, ao se reduzir, perde a sua

coloração púrpura. Antioxidantes sintéticos butil hidroxi tolueno (BHT) e ácido ascórbico foram utilizados como padrões.

Alíquotas dos fermentados de cagaíta, jabuticaba e pitaya (amostras), ácido ascórbico e BHT (padrões) foram diluídas com metanol para se obter três diferentes concentrações. Alíquotas de 0,1 mL de cada amostra foram adicionadas a 3,9 mL de solução metanólica do radical livre DPPH 0,06 mM. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura da absorbância em 515 nm, contra um branco específico. Como controle, foram utilizados 3,9 mL de solução metanólica de DPPH 0,06 mM e 0,1 mL de metanol.

A capacidade de sequestrar o radical livre foi expressa por meio do valor da concentração inibitória (IC50), que representa a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH.

2.6.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro

O poder antioxidante de redução do ferro foi estimado pelo *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), que se baseia na capacidade do composto de reduzir o Fe (III) em Fe (II) (BENZIE; STRAIN, 1996), utilizando a metodologia desenvolvida por Rufino et al. (2006). O reagente de FRAP foi preparado misturando-se (a) tampão acetato de sódio 300 mM a pH 3,6; (b) solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM em HCl 40 mM e (c) solução de cloreto férrico 20 mM. Para obter o reativo FRAP, os reativos a, b e c foram misturados na proporção de 10:1:1, no momento da análise. Como padrões foram utilizados o butil hidroxi tolueno (BHT) e o ácido ascórbico.

Nos tubos de ensaio foram adicionados 3 mL do reagente FRAP e 100 µL das amostras e padrões diluídos em três diferentes concentrações, e a leitura da absorbância foi feita a 595 nm. O complexo formado por esta reação tem

coloração azul intensa, com absorção máxima a 593 nm. Plotou-se uma curva padrão de sulfato ferroso e os resultados foram expressos em mM $\text{FeSO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$.

2.7 Quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os compostos fenólicos individuais foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência Agilent modelo 1100, equipado com bomba binária, injetor automático e detector UV, no comprimento de onda de 280 e 271 nm, segundo a metodologia de Aquino et al. (2006), com modificações. As amostras de vinhos de frutas e os padrões foram separados em uma coluna ascentis C18 (250mm x 4,6 mm, 5 μm), conectada a uma pré-coluna ascentis C18 (20 mm x 4,0 mm, 5 μm). A fase móvel foi composta pelas soluções: ácido acético 2% (A) e metanol:água:ácido acético 70:28:2 (v/v/v) (B). As análises foram realizadas com tempo total de 50 minutos. O fluxo utilizado em todas as análises foi de 1 mL.min⁻¹ e o volume da injeção, de 20 μL .

Foram utilizados os padrões ácido gálico, catequina, ácido cafeíco, vanilina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido m-cumárico, ácido o-cumárico, ácido rosmárico, quercetina, ácido trans-cinâmico e ácido cafeoilquínico. As soluções estoque dos padrões foram preparadas em dimetil sulfoxido e/ou metanol (Merck). As curvas foram construídas por meio da injeção das soluções padrões em sete diferentes concentrações em intervalos de 0,01 mg.L⁻¹ a 17 mg.L⁻¹. As amostras foram filtradas em membrana de náilon de 0,45 μm (Milipore®) e injetadas diretamente sem qualquer tratamento. Picos correspondentes a cada um dos compostos fenólicos nos extratos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. A quantificação foi realizada por meio da construção de curvas analíticas, em que cada ponto representou a média de três repetições.

2.8 Análises estatísticas

Os dados de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e compostos fenólicos individuais foram submetidos à análise variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o software de estatística Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

Análise de correlação linear de Pearson e a análise de componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando o software XLSTAT, versão 2014.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise dos mostos durante o processo fermentativo

O processo de fermentação dos mostos de cagaita, jabuticaba e pitaya inoculados com a levedura *S. cerevisiae* CCMA 0200 foi acompanhado pelas análises de sólidos solúveis (SS), açúcares redutores (glicose e frutose), pH, contagem de células viáveis e etanol.

Durante o processo fermentativo, a concentração celular foi mantida entre $6,63 \log \text{ células.mL}^{-1}$ a $7,81 \log \text{ células.mL}^{-1}$, nos três fermentados alcoólicos estudados, mostrando sua boa adaptação ao meio de fermentação. Estes resultados podem ser comparados com os de Oliveira et al. (2011) em cujo trabalho, durante o processo fermentativo com o mosto de cagaita, a população de leveduras foi mantida entre 10^6 e 10^8 cel.mL^{-1} .

O processo de sulfitagem utilizado no presente trabalho ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) mostrou-se eficiente no controle microbiano, pois, durante a contagem de células viáveis, não foi observada a presença de bactérias. Dias et al. (2007) e Dias, Schwan e Lima (2003) verificaram que a utilização de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de SO_2 na elaboração de vinho de cajá e cacau foi efetiva para a inibição de bactérias indesejáveis, durante a fermentação.

O consumo de açúcares pela levedura *S. cerevisiae* CCMA 0200 se deu de forma mais rápida no fermentado alcoólico de cagaita e, no tempo de 144 horas, estabilizou-se em torno de $5,26 \text{ °Brix}$, encerrando a fermentação. No fermentado alcoólico de pitaya, a fermentação se encerrou com 168 horas, quando o °Brix se estabilizou em torno de 6 e, no fermentado alcoólico de jabuticaba, a fermentação se encerrou com 192 horas, estabilizando-se em torno de $5,7 \text{ °Brix}$ (Figura 3).

A rápida velocidade de fermentação do mosto de cagaita pela levedura *S. cerevisiae* CCMA 0200 mostrou que a composição nutricional do mosto foi adequada para o crescimento e a multiplicação dessa levedura. Em geral, a mesma cepa de levedura se comporta diferentemente em resposta a diferentes mostos, que pode ser devido à composição química das frutas cagaita, jabuticaba e pitaya, como fonte de carbono, nitrogênio e sais minerais. As condições nutricionais, o pH, a acidez e a temperatura são fatores que podem influenciar o processo fermentativo (LEBEAU; JOUENE; JUNTER, 1998).

Alves et al. (2011) avaliaram três cepas de *S. cerevisiae* (UFLA CA11, UFLA CA1174 e UFLA CA1183) em mosto de lichia e demonstraram que o consumo do açúcar do mosto foi mais rápido pelas leveduras UFLA CA11 e UFLA CA1183, e os teores de sólidos solúveis ficaram em torno de 8,1 e 8,2, respectivamente, no final da fermentação, após 9 dias.

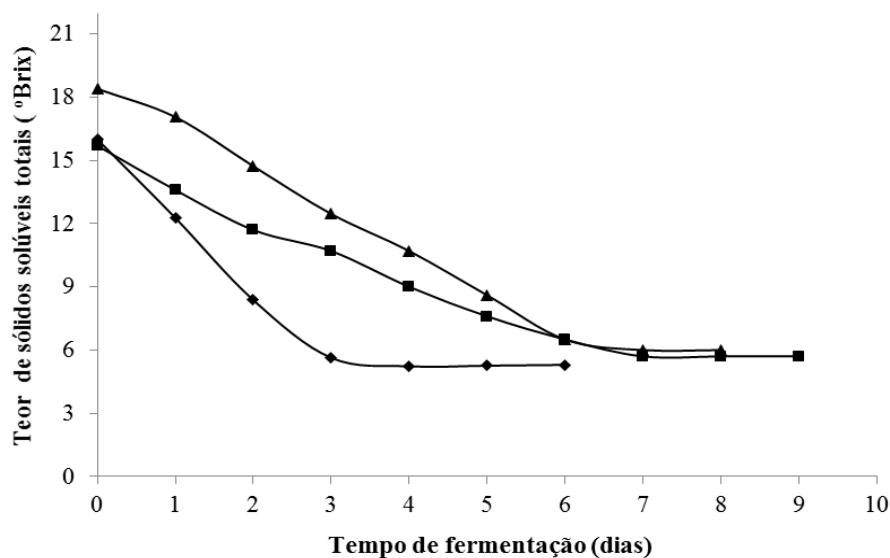


Figura 3 Consumo de sólidos solúveis durante os processos fermentativos para a obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita (—●—) jabuticaba (—■—) e pitaya (—▲—)

Na Figura 4 estão demonstrados os valores dos açúcares totais presentes nos mostos de cagaita, jabuticaba e pitaya, durante os processos fermentativos conduzidos com a levedura *S. cerevisiae* CCMA 0200. A concentração de açúcar residual foi de 1,30 g.L⁻¹, 1,45 g.L⁻¹ e 0,8 g.L⁻¹, para fermentados de cagaita, jabuticaba e pitaya, respectivamente.

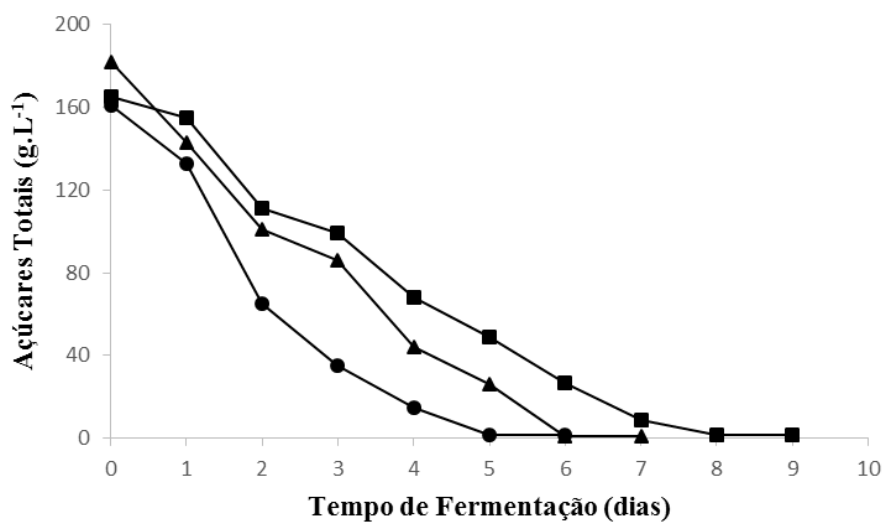


Figura 4 Consumo de açúcares totais durante os processos fermentativos para a obtenção das bebidas alcoólicas fermentadas de cagaita (—●—), jabuticaba (—■—) e pitaya (—▲—)

Na Figura 5 estão apresentados os valores de etanol e glicerol obtidos durante o processo fermentativo do mosto de cagaita, jabuticaba e pitaya, utilizando a levedura *S. cerevisiae* CCMA 0200. As concentrações de etanol encontradas no último dia de fermentação foram de 62,26 g.L⁻¹ (7,9 °GL) para o mosto de cagaita, de 67,3 g.L⁻¹ (8,5 °GL) no mosto de jabuticaba e de 75,2 g.L⁻¹ (9,5 °GL) no mosto de pitaya. Esses valores estão de acordo com a legislação brasileira que determina que a graduação alcoólica da bebida fermentada de fruta deve ser entre 4% a 14% em volume, a 20 °C (BRASIL, 2009).

Um aumento da concentração de glicerol foi observado, sendo a concentração final deste composto no mosto de cagaita de 5,72 g.L⁻¹, de 7,01 g.L⁻¹ no mosto de jabuticaba e de 9,33 g.L⁻¹ no mosto de pitaya (Figura 5). As concentrações, tanto do etanol quanto do glicerol, podem contribuir no “corpo” do vinho, além da doçura, da acidez, do sabor e da viscosidade (GAWEL; SLUYTER; WATERS, 2007). A concentração de glicerol dos fermentados de frutos do presente trabalho estão de acordo com os encontrados por Duarte et al. (2010b) e Oliveira et al. (2011), nos fermentados de cagaita e jabuticaba, respectivamente.

O glicerol é, quantitativamente, o mais importante subproduto da fermentação alcoólica, depois do etanol e do dióxido de carbono. Este composto não contribui diretamente para o aroma, devido à sua natureza não volátil, mas contribui significativamente para a qualidade do vinho, proporcionando doçura, suavidade e plenitude (REMIZE; SABLAYROLLES; DEQUIN, 2000; YALCINI; OZBAS, 2008). A concentração de glicerol geralmente formada por *S.cerevisiae* em vinhos varia de 1 a 15 g.L⁻¹ (REMIZE; SABLAYROLLES; DEQUIN, 2000).

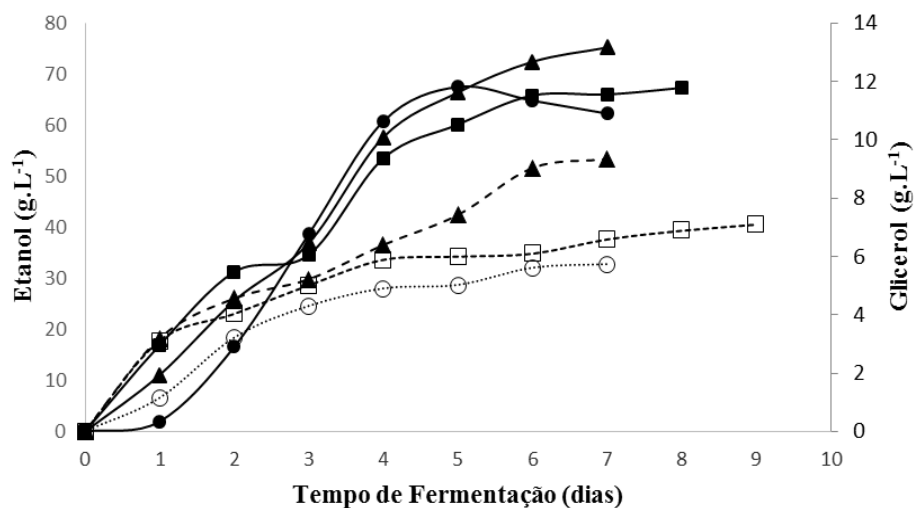


Figura 5 Concentrações de etanol (linha contínua) e glicerol (linha pontilhada) obtidas durante os processos fermentativos para a obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas cagaita (—●—, —○—), jabuticaba (—■—, —□—) e pitaya (—▲—, —△—)

Os valores do pH não apresentaram grandes variações, atingindo seu valor final de, aproximadamente, 3,41 para o fermentado alcoólico de cagaita, de 3,65 para o de jabuticaba e de 3,83 para o de pitaya (Figura 5). O pH final de bebidas alcoólicas fermentadas situa-se, normalmente, entre 2,0 e 4,0. Aumento da acidez e redução dos valores de pH são decorrentes da produção de ácidos orgânicos, como lático, succínico e acético (Tabela 2).

O fermentado de pitaya apresentou os maiores valores de rendimento em etanol (Y_p/s) ($0,42 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$), rendimento em glicerol (Y_g/s) ($0,05 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$), produtividade em etanol (Q_p) ($0,45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e eficiência fermentativa (E_f) (81,42 %), quando comparado aos fermentados de cagaita e jabuticaba (Tabela 1).

Tabela 1 Parâmetros cinéticos obtidos dos fermentados alcoólicos de cagaita, jabuticaba e pitaya, conduzidos com *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200

Fermentado de frutas	Variáveis			
	Yp/s (g/g)	Yg/s (g/g)	Qp (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Ef (%)
Cagaita	0,39	0,04	0,433	76,44
Jabuticaba	0,41	0,04	0,31	80,69
Pitaya	0,42	0,05	0,45	81,42

Os valores de rendimento em etanol do presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por Duarte et al. (2010b), quando estudaram a fermentação alcoólica de framboesa e obtiveram valores em torno de 0,38 g.g⁻¹ a 0,49 g.g⁻¹. No entanto, verificou-se que a produtividade dos fermentados de frutas foi menor que a encontrada por este mesmo autor, o que pode ser explicado pelo tempo de fermentação.

3.2 Análises cromatográficas das bebidas fermentadas

Ao longo do processo de fermentação são produzidos ácidos orgânicos que são compostos de grande importância, pois têm influência sobre diversas propriedades organolépticas, como aroma, sabor e cor, e também estão relacionados ao controle da estabilidade microbiológica das bebidas (MATO; LUQUE; HUIDOBRO, 2005). Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações de ácidos oxálico, cítrico, málico, succínico, acético e lático das bebidas fermentadas de cagaita, jabuticaba e pitaya. Os ácidos tartárico, butírico e propiônico não foram detectados durante o processo fermentativo. Em vinhos de uva, os ácidos podem ser provenientes da fruta (tartárico, málico e cítrico) ou da fermentação (succínico, lático, acético, butírico, fórmico e propiônico) e estão presentes em quantidades que variam de 5 a 7 g.L⁻¹, equivalente a 1% a 8% em volume (JEFERY; WILKINSON, 2014).

A concentração de ácido succínico foi maior em todos os fermentados avaliados neste trabalho, sendo de 4,07, 7,30 e 5,27 g.L⁻¹ para cagaita, jabuticaba e pitaya, respectivamente. A produção de ácido succínico é comum entre as leveduras e é o principal ácido carboxílico produzido durante a fermentação (HEERDE; RADLER, 1978). O sabor deste ácido é relatado como sendo uma mistura de gosto ácido, salgado e amargo (WITHING, 1976). Resultados semelhantes já foram descritos, tendo sido relatada a concentração de 3,61 g.L⁻¹ de ácido succínico em fermentado de cagaita e de 5,11 g.L⁻¹ em fermentado de jabuticaba (DUARTE et al., 2010c; OLIVEIRA et al., 2011).

O ácido acético também foi encontrado nos três fermentados de fruta analisados neste estudo (Tabela 2), tendo o fermentado de cagaita apresentado a maior concentração, 4,76 g.L⁻¹. Valor de ácido acético abaixo do encontrado neste trabalho foi detectado por Oliveira et al. (2011), utilizando *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11 livre ou imobilizada. As concentrações de ácido acético para o fermentado de jabuticaba e pitaya foram de 0,11 e 0,46 g.L⁻¹, respectivamente. Geralmente, a concentração deste ácido deve ser menor que 0,7 g.L⁻¹, para evitar sabor e odor de vinagre (DUARTE et al., 2010c).

A presença de ácido málico, assim como de outros ácidos, é de grande importância em vinhos e pode estar diretamente relacionada com a acidez (VOLSCHENK; VUUREN; VILJOEN-BLOOM, 2006). A presença deste ácido foi detectada apenas nos fermentados de cagaita e de jabuticaba, nas concentrações de 1,22 e 0,96 g.L⁻¹, respectivamente.

O ácido cítrico está comumente presente em vinhos, em concentrações de 0,1 e 0,7 g.L⁻¹. Este ácido pode ser metabolizado por numerosos gêneros de bactérias lácticas e resulta na produção de ácido acético e diacetil, os quais têm importante efeito sobre o *flavor* do vinho (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2004). O fermentado de jabuticaba apresentou teor mais elevado de ácido cítrico (7,51 g.L⁻¹). Estudos demonstraram diferenças de ácido cítrico em fermentados de

frutas, como 0,5 g.L⁻¹ no fermentado de cajá (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003) e 5,5 g.L⁻¹ no fermentado de cacau (DIAS et al., 2007).

Tabela 2 Concentração de ácidos orgânicos presentes nas bebidas fermentadas de cagaita, jabuticaba e pitaya, detectados por CLAE

Ácidos orgânicos	Cagaita	Jabuticaba	Pitaya
	g.L ⁻¹		
Oxálico	0,98	0,10	ND
Cítrico	0,76	7,51	0,17
Málico	1,22	0,96	ND
Succínico	4,07	7,30	5,27
Acético	4,76	0,11	0,46
Lático	0,71	ND	ND

ND – Não detectado

Além do etanol e CO₂, as leveduras produzem também muitos compostos que conferem sabor à bebida, durante a fermentação alcoólica. Pequenas quantidades de compostos voláteis podem contribuir positivamente para a qualidade do vinho, enquanto excessivas concentrações podem ter efeitos prejudiciais (ANTONELLI et al., 1999; NURGEL et al., 2002).

Os compostos voláteis identificados nos fermentados alcoólicos de cagaita, jabuticaba e pitaya estão listados na Tabela 3. Foram identificados 25 compostos nos fermentados, incluindo aldeídos (1), álcool (1), álcoois superiores (8), terpeno (1), acetato (1), dieter (1), furano (1), ácidos graxos voláteis (5), cetona (1) e etil éster (5).

Acetaldeído foi o único aldeído identificado nos fermentados de frutas, em baixos níveis; ele fornece um agradável aroma frutado, mas, em altas concentrações, é um composto indesejável, que confere sabor oxidado aos vinhos (MIYAKE; SHIBAMOTO, 1999). A maior concentração foi de 22,1 mg.L⁻¹, no fermentado de pitaya, seguido do fermentado de cagaita, 15,3 mg.L⁻¹ e do de jabuticaba 13,2 mg.L⁻¹. Os valores de acetaldeído encontrados nos

fermentados alcoólicos deste trabalho se encontram abaixo do limiar de percepção que, segundo Liu e Pilone (2000), é de 100 mg.L⁻¹.

Foram identificados oito álcoois superiores nos fermentados de cagaita, jabuticaba e pitaya (Tabela 3). Dentre eles, álcoois isoamfílicos (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol) foram os mais abundantes em todos os fermentados: 147,91 mg.L⁻¹ no fermentado de cagaita, 207,96 mg.L⁻¹ no fermentado de jabuticaba e 229,1 mg.L⁻¹ fermentado de pitaya. Os compostos 2-metil, 1-propanol, 2-feniletanol e 2-propanol também foram detectados nos três fermentados de frutas (Tabela 3). Álcoois superiores, segundo Jefery e Wilkinson (2014), surgem por meio do metabolismo de açúcares e aminoácidos. São compostos voláteis predominantes nas fermentações (centenas de mg.L⁻¹). Quando presente em níveis normais, as características de fruta são positivas, mas, em quantidades excessivas (ex: em torno de 300 a 400 mg.L⁻¹ ou mais), o resultado é menos desejável por produzir aromas desagradáveis.

Todos os fermentados de frutas também apresentaram teores de metanol variando de 12,7 mg.L⁻¹ (fermentado de jabuticaba) até 36,9 mg.L⁻¹ (fermentado de pitaya) (Tabela 3). O metanol é um álcool tóxico, naturalmente presente nas bebidas alcoólicas, em quantidades inferiores à dos demais componentes. Este composto não é produzido pela levedura durante a fermentação, mas pela hidrólise da pectina presente em algumas matérias-primas (CAVAROGLU, 2005; PEINADO et al., 2004). Os valores de metanol encontrados nos fermentados de frutas deste trabalho estão abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira, que é de 350 mg.L⁻¹ (BRASIL, 1988).

Os ácidos graxos voláteis octanóico e decanóico foram os mais abundantes encontrados nos fermentados de frutas, especialmente no fermentado de cagaita, 19,1 mg.L⁻¹ e 23,3 mg.L⁻¹, respectivamente. Estes ácidos são produzidos pelas leveduras durante o processo fermentativo. Embora minoritários em vinhos de frutas, os ácidos graxos voláteis juntos contribuem

significativamente com o aroma do vinho (DUARTE et al., 2010b, 2010c). Altos níveis de ácidos voláteis podem causar menor aceitação, por conferirem aromas com descrições como “vinagre”, “acre”, “manteiga”, “gordura” ou “rançoso” (JEFERY; WILKINSON, 2014).

O etil éster mais abundante encontrado nos fermentados alcoólicos foi o etil octanoato: 70,2 mg.L⁻¹ no fermentado de cagaita, 82,3 mg.L⁻¹ no fermentado de jabuticaba e 293 mg.L⁻¹ no fermentado de pitaya, que foi o teor mais alto entre os três fermentados (Tabela 3). As concentrações de etil octanoato obtidas neste trabalho foram superiores às encontradas por Duarte et al. (2010a), no fermentado de jabuticaba (0,0023 mg.L⁻¹) e por Oliveira et al. (2011), no fermentado de cagaita (0,13 mg.L⁻¹).

Em relação ao teor de acetato de etila, todos os fermentados de frutas deste trabalho apresentaram concentrações abaixo do limiar de percepção (Tabela 3) que devem ser menores que 150 mg.L⁻¹ (MAKHOTKINA; PINEAU; KILMARTIN, 2012). O valor de acetato de etila encontrado por Alves et al. (2011) e Dias, Schwan e Lima (2003), nos fermentados de cajá e lichia, superaram os valores considerados positivos para o aroma do vinho.

As concentrações de etil éster são especialmente importantes no aroma de vinhos de frutas e contribuem de forma positiva na qualidade global da bebida. Suas concentrações dependem de vários fatores, como a cepa da levedura utilizada, a temperatura da fermentação, a aeração e os teores de açúcar. A maioria deles confere à bebida sabor maduro e aroma frutado, incluindo “banana”, “rosa”, “abacaxi”, “maçã”, “floral” e “morango”, contribuindo para os aromas frutados em geral (JEFERY; WILKINSON, 2014; PERESTRELO et al., 2006; SWIEGERS et al., 2005).

Tabela 3 Concentração de compostos voláteis (mg.L⁻¹) identificados nos vinhos de cagaita, jabuticaba e pitaya, por CG-FID

N°	Compostos	Fermentado de frutas		
		Cagaita	Jabuticaba	Pitaya
	Aldeído (1)			
1	Acetaldeído	15,3	13,2	22,1
	Álcoois (1)			
2	Metanol	31,1	12,7	36,9
	Álcoois superiores (8)			
3	1-Hexanol	4,0	ND	ND
4	2-Heptanol	ND	0,7	ND
5	2-Metil-1-propanol	28,9	53,1	61,2
6	2-Metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol	147,91	207,96	229,1
7	2- Feniletanol	55,5	64,3	51,0
8	3-Metil-1-pentanol	1,0	ND	3,4
9	1-Propanol	ND	3,7	ND
10	2-Propanol	78,5	22,1	21,4
	Terpeno (1)			
11	α -Terpeniol	ND	19,1	9,7
	Acetato (1)			
12	2-Feniletil acetato	3,5	6,7	1,4
	Diether (1)			
13	1,1-dietoxietano	10,7	1,1	0,7
	Furans (1)			
14	Álcool furfurílico	3,3	1,0	1,7
	Ácidos graxos voláteis (5)			
15	Ácido decanóico	19,1	5,7	7,2
16	Ácido isobutírico	5,7	3,5	2,2
17	Ácido hexanóico	1,7	1,5	1,1
18	Ácido propiônico	1,8	1,1	1,4
19	Ácido octanóico	23,3	0,6	1,0
	Cetona (1)			
20	Acetoína	1,2	0,5	2,9
	Etil éster (5)			
21	Dietil malato	13,9	2,0	0,6
22	Dietil succinato	4,8	1,5	1,3
23	Butirato de etila	15,2	ND	22,1
24	Acetato de etila	4,0	6,5	6,6
25	Octanoato de etila	70,2	82,3	293

Os resultados obtidos para os compostos voláteis das bebidas fermentadas de cagaita, jabuticaba e pitaya foram submetidos à análise do componente principal (PCA).

Análise de componente principal (PCA) foi aplicada com no intuito de obter uma visão mais simplificada em relação aos compostos voláteis analisados. A representação gráfica dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) responde por 100% da variabilidade total entre as bebidas fermentadas (59,76% e 40,24%, respectivamente) (Figura 6).

A bebida fermentada de cagaita aparece destacadamente no lado positivo do primeiro componente (PC1) e está fortemente relacionada com as concentrações de 2-propanol, 1,1 dietoxietano, álcool furfurílico, ácidos graxos voláteis, dietil malato e dietil succinato. O outro grupo, formado pela bebida fermentada de jabuticaba, localizada na parte positiva do segundo componente (PC2), está fortemente relacionado com os teores de 2-hepanol, 1-propanol, 2-feniletanol, 2-feniletil acetato e α -terpeniol. Já a bebida fermentada de pitaya relacionou-se, principalmente, com os teores de acetaldeído, 2-metil-1-propanol, álcool isoamílico (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol), 3-metil-1-pentanol, acetoína e octanoato de etila, localizada no eixo negativo do primeiro e do segundo componente (PC1 e PC2).

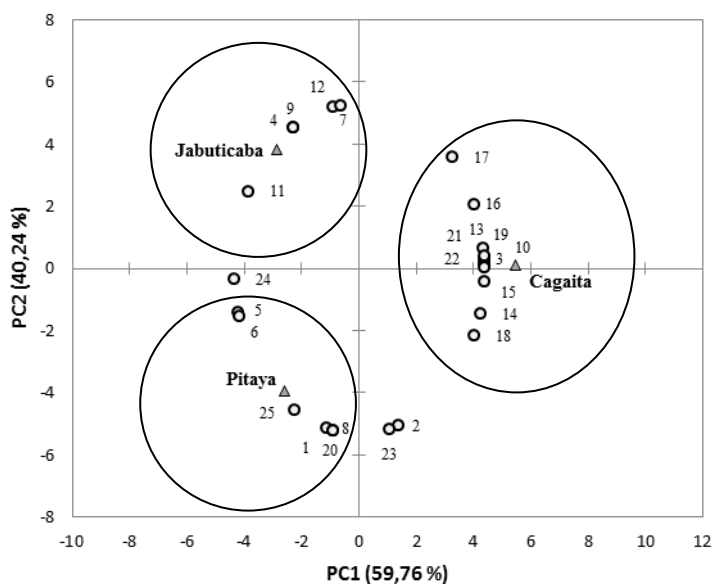


Figura 6 Análise de componente principal (PCA) de compostos voláteis dos fermentados de cagaita, jabuticaba e pitaya. Os números dos compostos voláteis estão destacados na Tabela 3

3.3 Determinação de fenóis totais

Os resultados da determinação do teor de compostos fenólicos totais nos fermentados de cagaita, jabuticaba e pitaya pelo método Folin-Ciocalteu estão apresentados na Tabela 4. O teor de fenólicos totais foi significativamente maior no vinho de cagaita (22,06 mg Eq.ácido gálico.L⁻¹), seguido do vinho de jabuticaba (12,71 mg Eq.ácido gálico.L⁻¹) e o menor valor foi encontrado no vinho de pitaya (2,80 mgEq ácido gálico.L⁻¹). As concentrações de compostos fenólicos podem variar consideravelmente, dependendo das variedades de frutas, fatores ambientais e técnicas de processamento (KUMAR; VARAKUMAR; REDDY, 2012; VILANO et al., 2006).

Tabela 4 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos fermentados de cagaita, jabuticaba e pitaya

Fermentado de frutas	Fenólicos totais (mg.Eq.ácido gálico.L ⁻¹)	DPPH (IC ₅₀ mg.L ⁻¹) *	FRAP (mM sulfato ferroso.L ⁻¹)
Cagaita	22,06 ^a	0,51 ^a	775,33 ^a
Jabuticaba	12,71 ^b	5,21 ^b	315,45 ^d
Pitaya	2,80 ^c	46,6 ^d	15,35 ^e
Butil hidroxi tolueno (BHT)	-	6,10 ^c	372,32 ^c
Ácido ascórbico	-	5,26 ^b	510,00 ^b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (p<0,05)

* IC₅₀ - Concentração final necessária para a inibição do radical DPPH em 50%

Não existe, na literatura, qualquer informação acerca da quantificação de compostos fenólicos para fermentados alcoólicos de cagaita e pitaya. No entanto, estudos de compostos fenólicos totais das frutas *in natura* utilizadas no presente trabalho já foram realizados (BELTRÁN-OROZCO et al., 2009; CASTRO et al., 2014; REYNERTSON et al., 2008; ROCHA et al., 2011, 2013; WU et al., 2006).

O teor de compostos fenólicos do fermentado de jabuticaba do presente trabalho foi inferior aos encontrados por Sá et al. (2014). O maior conteúdo de fenólicos foi encontrado no fermentado tinto de jabuticaba (1105 µg Eq.ácido gálico.mL⁻¹). Os fermentados rosé e branco apresentaram níveis moderados e similares de fenólicos totais, 406 µg Eq.ácido gálico.mL⁻¹ e 373 µg Eq.ácido gálico.mL⁻¹, respectivamente. A cor vermelha da bebida de jabuticaba é devido à presença da casca, que contém grandes quantidades de antocianinas. Como esperado, este fermentado apresentou maior conteúdo fenólico.

De acordo com Chaovanalikit e Wrolstad (2004), durante a vinificação, os compostos fenólicos passam dos frutos para os vinhos e permanecem ativos, mas o perfil pode mudar e parcialmente degradar durante o processamento, a fermentação e o envelhecimento. Os resultados encontrados neste estudo

demonstraram que, mesmo após a fermentação da polpa, os fermentados de frutas, principalmente de cagaita e de jabuticaba, contêm quantidades de compostos fenólicos comparáveis aos resultados encontrados nas frutas *in natura*.

3.4 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante dos fermentados alcoólicos foi avaliada com base na captura do radical livre de DPPH (método DPPH) e na capacidade de redução do ferro (método FRAP) (Tabela 4). As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências. Por isso, devem-se utilizar duas ou mais técnicas (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

As substâncias antioxidantes presentes nas amostras reagem com o DPPH, que é um radical estável, e converte-o em 2,2-difenil-1-picril hidrazina. O grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato. Um extrato que apresenta alto potencial em sequestrar radicais livres tem baixo valor de IC_{50} . A capacidade dos fermentados de frutas em sequestrar radicais livres foi expresso como concentração final de cada fermentado, necessária para a inibição do radical DPPH em 50% (IC_{50}) (Tabela 4).

O menor valor de IC_{50} foi obtido para o fermentado alcoólico de cagaita (IC_{50} 0,51 mg.L⁻¹), o que demonstra elevada atividade antioxidante desta bebida. A capacidade deste fermentado alcoólico em sequestrar radicais DPPH foi, aproximadamente, 10 vezes maior que os antioxidantes padrões: BHT e ácido ascórbico, e, aproximadamente, 90 vezes maior que o fermentado de pitaya (IC_{50} 46,6 mg.L⁻¹). O poder antioxidante do fermentado de jabuticaba foi estatisticamente semelhante ao do ácido ascórbico (Tabela 4).

A atividade antioxidante dos fermentados de cagaita, jabuticaba e pitaya também foi avaliada em relação à capacidade de redução do ferro, por meio do método FRAP. Este método avalia a força antioxidante da amostra, via avaliação da redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) a complexo ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) por redutores presentes na amostra. Baseia-se no fato de que a habilidade de um composto em produzir Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} define sua força antioxidante (BENZIE; STRAIN, 1999). Dessa maneira, quanto maior o valor, maior produção de Fe^{2+} e mais antioxidante é a amostra.

Os valores encontrados para a atividade antioxidante determinada pelo método FRAP também apresentaram significativa diferença entre os fermentados de frutas. Conforme os resultados da Tabela 4, o poder redutor do fermentado alcoólico de cagaita foi expressivo (775,3 mM sulfato ferroso.L⁻¹), seguido do fermentado alcoólico de jabuticaba (315,4 mM sulfato ferroso.L⁻¹), que apresentou poder redutor semelhante ao do BHT. A atividade antioxidante do fermentado de pitaya determinada pelo método FRAP foi significativamente menor que a dos demais fermentados (15,35 mM sulfato ferroso.L⁻¹).

A cagaita, dentre os frutos do cerrado, já foi relada por apresentar atividade antioxidante, assim como no presente estudo. Recentemente, Rocha et al. (2013) avaliaram a atividade de sequestro do radical livre DPPH pelos extratos alcoólicos e aquosos de cinco frutos do cerrado (cagaita, chichá, cajuzinho-do-cerrado, jatobá-do-cerrado e macaúba). Os resultados obtidos demonstraram que tanto o extrato alcoólico quanto o aquoso da cagaita apresentaram a melhor capacidade de reduzir o radical livre DPPH em 50%, 430,92 mg.L⁻¹ (extrato alcoólico) e 970,27 mg.L⁻¹ (extrato aquoso), podendo tal capacidade ser se atribuída ao teor de β -caroteno e vitamina C desse fruto.

Roesler et al. (2007) estudaram a atividade antioxidante de frutos do cerrado e observaram que o extrato etanólico da semente de cagaita apresentou expressiva capacidade de sequestrar radicais DPPH (IC₅₀ igual a 14,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Os autores ainda verificaram relação direta entre o teor de compostos fenólicos destes frutos com atividade antioxidante, assim como observado no presente estudo.

Em estudos realizados por Gregoris et al. (2013) também foi demonstrado que a pitaya apresentou baixa atividade antioxidante, assim como no presente estudo, quando comparado com os fermentados de cagaita e jabuticaba.

Barros, Campos e Moreira (2010), utilizando diferentes metodologias, comprovaram atividade antioxidante de vinhos tintos e brancos secos de jabuticaba. Os autores verificaram que o vinho tinto da jabuticaba apresentou melhor atividade antioxidante. O fermentado alcoólico de jabuticaba desenvolvido neste estudo foi o branco, pois foi utilizada apenas a polpa da fruta e, com isso, comprova-se a atividade antioxidante exercida por outros compostos fenólicos que não sejam antocianinas.

Os resultados de atividade antioxidante avaliados pelo método FRAP foram semelhantes aos do DPPH-IC50, revelando que tanto o fermentado de cagaita quanto o de jabuticaba, além de grande capacidade em sequestrar radical livre (DDPH), têm elevada capacidade redutora.

A análise de correlação foi utilizada para explorar as relações entre os diferentes parâmetros antioxidantes avaliados para todos os fermentados de frutas (Tabela 5). O conteúdo de compostos fenólicos pode ser considerado um bom indicador de atividade antioxidante nos fermentados analisados, pois foi significativamente correlacionado ($p < 0,01$) com a atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e FRAP. Isso ressalta o papel preponderante dos fenólicos na atividade antioxidante (BÜYÜKTUNCEL; POR GAL; ÇOLAK, 2014; PAIXÃO et al., 2007).

Foi observada significativa correlação negativa entre teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, determinada pelo DPPH ($r = -0,916$), descrita

como valor de IC₅₀. Assim, para tal metodologia, quanto maior o teor de fenólicos, menor o valor de IC₅₀. O mesmo ocorreu entre os métodos utilizados para quantificar as atividades antioxidantes DPPH e FRAP, as quais foram significativamente negativas, $r = -0,852$. Já a atividade antioxidante pelo método FRAP mostrou correlação positiva com o teor de fenóis totais ($r = 0,991$).

Tabela 5 Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos fermentados de frutas

Variáveis	Fenólicos totais	DPPH	FRAP
Fenólicos totais	1		
DPPH	-0,916	1	
FRAP	0,991	-0,852	1

Os valores em negrito são diferentes de 0, com um nível de significância $\alpha=0,01$

Katalinic et al. (2004) avaliaram o poder antioxidante de vinhos tintos e brancos de diferentes variedades de uvas. Como esperado, os vinhos tintos demonstraram capacidade antioxidante significativa, devido à quantidade de fenólicos totais, flavonoides, antocianinas e catequinas, comparados ao vinho branco. Segundo estes autores, a correlação significativa entre a capacidade antioxidante de vinhos foi confirmada com os métodos DPPH, FRAP e β -caroteno e está fortemente correlacionada com o teor de polifenóis, assim como no presente estudo.

Diversos estudos verificaram alta correlação entre o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante de vinhos de diferentes países (BÜYÜKTUNCEL; PORCAL; ÇOLAK, 2014; CAVULDAK; ANL; VURAL, 2013; FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2004; FERREIRA-LIMA; BURIN;

BORDIGNON-LUIZ, 2013; LI et al., 2009; LUCENA et al., 2010; PAIXÃO et al., 2007).

3.5 Quantificação de compostos fenólicos individuais

Foram quantificados três compostos fenólicos dentro do intervalo de concentração utilizado, nos fermentados de cagaita, jabuticaba e pitaya (Tabela 7). Os compostos fenólicos quantificados foram catequina, quercetina e ácido gálico.

Tabela 7 Compostos fenólicos individuais ($\mu\text{g.L}^{-1}$) determinados por CLAE nos fermentados de cagaita, jabuticaba e pitaya

Compostos fenólicos individuais	Fermentado de frutas		
	Cagaita	Jabuticaba	Pitaya
Catequina	121,09±0,33 ^a	44,11±4,22 ^b	51,82±5,18 ^b
Quercetina	19,21±1,30 ^a	ND	ND
Ácido gálico	789,3±4,20 ^a	35,47±3,70 ^b	30,52±3,74 ^b

± Desvio padrão das médias; Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$); ND-não detectado

Dentre os compostos fenólicos quantificados nos fermentados, ácido gálico (ácido fenólico) e catequina (flavonóide) foram os predominantes em todos os fermentados de frutas avaliados no presente trabalho.

O ácido gálico foi o único ácido fenólico encontrado no fermentado de cagaita ($789,3 \mu\text{g.L}^{-1}$) e se destacou por apresentar maior concentração em relação aos fermentados de jabuticaba ($35,47 \mu\text{g.L}^{-1}$) e pitaya ($30,52 \mu\text{g.L}^{-1}$), que não diferiram estatisticamente entre si.

A catequina foi o composto flavonoide presente em maior concentração, em todas as amostras analisadas, variando de 121,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$, no fermentado de cagaita a 51,82 $\mu\text{g.L}^{-1}$, no fermentado de pitaya e 44,11 $\mu\text{g.L}^{-1}$, no fermentado de jabuticaba. O fermentado de cagaita também foi o único que apresentou quercetina, outro composto flavonóide (19,21 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Ferreira-Lima, Burin e Bordignon-Luiz (2013) avaliaram a atividade antioxidante de vinhos brancos da variedade Goethe, produzidos em Santa Catarina. A catequina foi o composto flavonoide presente em maior concentração, variando em uma faixa de 18,90 a 28,09 mg.L^{-1} , concentração superior ao encontrado no presente trabalho. A concentração de ácido gálico variou de 0,85 a 2,00 mg.L^{-1} , provando que o fermentado de cagaita tem concentração de ácido gálico semelhante à dos vinhos brancos da variedade Goethe.

Os resultados mostraram que as bebidas fermentadas, principalmente produzidas a partir de cagaita e jabuticaba, têm atividade antioxidante. Essas características conferem potencial de utilização dessas bebidas como fonte de substâncias bioativas, apresentando potenciais efeitos benéficos para a saúde humana.

4 CONCLUSÕES

Foi possível obter fermentados de frutas a partir das polpas de cagaita, jabuticaba e pitaya. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 foi capaz de consumir rapidamente os açúcares fermentescíveis presentes no mosto, convertendo-os em etanol, glicerol, ácidos orgânicos e compostos voláteis importantes para o aroma e o *flavor* das bebidas.

As bebidas alcoólicas fermentadas obtidas apresentaram teor alcoólico dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

Os fermentados alcoólicos deste estudo apresentaram diferenças importantes, o que pode ser percebido pela análise de componentes principais que permitiram a separação das três bebidas em grupos distintos, com base nas concentrações dos compostos voláteis.

Dentre os fermentados analisados, destacou-se o expressivo poder antioxidante dos fermentados de cagaita e jabuticaba. A atividade antioxidante foi altamente correlacionada com o conteúdo fenólico. Assim, é satisfatória a produção dessas bebidas, pois elas contêm quantidades expressivas de antioxidantes, que são substâncias que protegem as células contra os efeitos nocivos causados pelos radicais livres.

Este é o primeiro estudo do conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante dos fermentados de frutas tropicais e exóticas cagaita, jabuticaba e pitaya. Para estabelecer um perfil completo dos fermentados de frutas, são necessárias análises complementares, como quantificação de outros compostos fenólicos que podem estar presentes e análises sensoriais.

REFERÊNCIAS

ABDILLE, M. H. et al. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 891-896, May 2005.

AKUBOR, P. I. et al. Production and quality evaluation of banana wine. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 58, n. 3, p. 1-6, 2003.

ALMEIDA, S. P. de; SILVA, J. A. da; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina: EMBRAPA - CPAC, 1987. 83 p.

ALVES, J. A. et al. Chemical, physical–chemical, and sensory characteristics of Lychee (*Litchi chinensis* Sonn) wines. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 5, p. 330-336, 2011.

ANTONELLI, A. et al. Yeast influence on volatile composition of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 3, p. 1139-1144, 1999.

AQUINO, F. W. B. et al. Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits. **Food Chemistry**, Oxford, v. 98, n. 3, p. 569-574, 2006.

ARIFFIN, A. A. et al. Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 114, n. 2, p. 561-564, May 2009.

ASQUIERI1, E. R.; SILVA, A. G. M.; CÂNDIDO, M. A. Aguardente de Jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de Jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 896- 904, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTY. **Official methods of analysis**. 17th ed. Arlington, 2000. v. 2.

BARROS, J. Â. C.; CAMPOS, R. M. M.; MOREIRA, A. V. B. Atividade antioxidante em vinhos de Jabuticaba e de uva. **Journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 73-83, 2010.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. The ‘buttery’ attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 235-252, Nov. 2004.

BELTRÁN-OROZCO, M. C. et al. Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus Riccobono*). **Agrociencia**, Montevideo, v. 43, n. 2, p. 153-161, 2009.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 15-27, 1999.

BRASIL. **Portaria nº 64**, de 23 de abril de 2008. Regulamento Técnico para a Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para a polpa de fruta. Brasília, 2008. Disponível em:
<<http://www.comprasgovernamentais.gov.br/paginas/portarias/portaria-no-64-de-23-de-maio-de-2014>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BRASIL. **Decreto nº 6.871**, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei nº 8918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BRASIL. **Lei nº 7.678**, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados de uva e do vinho, e de outras providências. Brasília, 1988. Disponível em:
<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=189>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BÜYÜKTUNCEL, E.; PORÇAL, E.; ÇOLAK, C. Comparison of total phenolic content and total antioxidant activity in local red wines determined by spectrophotometric methods. **Food and Nutrition Sciences**, London, v. 5, n. 17, p. 1660-1667, Sept. 2014.

CABAROGLU, T. Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. **Food Control**, Guildford, v. 16, n. 2, p. 177-181, Feb. 2005.

CASTRO, V. C. et al. Extraction, identification and enzymatic synthesis of acylated derivatives of anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 196-204, 2014.

CAVULDAK, Ö. A.; ANL, R. E.; VURAL, N. Phenolic composition and antioxidant capacity of some red wines from Turkey. **International Journal of Food Science and Nutrition Engineering**, Rosemead, v. 17, n. 3, p. 40-47, 2013.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanin and polyphenolic composition of fresh and processed cherries. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, n. 1, p. FCT73-FCT83, 2004.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, London, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009.

DIAS, D. R. et al. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Thebroma cacao* L.) pulp. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 319-329, Mar. 2007.

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

DONADIO, L. C. Jaboticaba. In: SANTOS-SEREJO, J. A. et al. (Ed.). **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2009a. p. 95-132.

DUARTE, W. F. et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 43, n. 10, p. 1564-1572, Dec. 2010a.

DUARTE, W. F. et al. Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 173-182, Oct. 2010b.

DUARTE, W. F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabirola (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, Apr. 2009.

DUARTE, W. F. et al. Optimization of fermentation conditions for production of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) spirit using the response surface methodology. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 5, p. 782-790, 2011.

DUARTE, W. F. et al. Raspberry (*Rubus idaeus L.*) wine: yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 9, p. 2303-2314, Nov. 2010c.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S. et al. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 563, n. 1/2, p. 101-108, 2006.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.

FERREIRA-LIMA, N. E.; BURIN, V. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Characterization of Goethe white wines: influence of different storage conditions on the wine evolution during bottle aging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 237, n. 4, p. 509-520, 2013.

GAWEL, R.; SLUYTER, S. van; WATERS, E. J. The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 13, n. 1, p. 38-45, 2007.

GREGORIS, E. et al. Antioxidant properties of Brazilian tropical fruits by correlation between different assays. **Biomed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-8, 2013.

HEERDE, E.; RADLER, F. Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. **Archiv für Mikrobiologie**, Berlin, v. 117, p. 269-276, 1978.

HERTOG, M. G. L. et al. Antioxidant flavonols and ischaemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 65, n. 5, p. 1489-1494, May 1997.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em:
<<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

ISHIGE, K. et al. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 30, n. 4, p. 433-446, Feb. 2001.

JEFFERY, D. W.; WILKINSON, K. L. Wine. In: BAMFORT, C. W.; WARD, R. (Ed.). **The Oxford handbook of food fermentations**. Oxford: Oxford University, 2014. p. 54-147.

KATALINIĆ, V. et al. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. **Food Chemistry**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 593-600, 2004.

KATSUBE, N. et al. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 1, p. 68-75, Jan. 2003.

KUMAR, Y. S.; VARAKUMAR, S.; REDDY, O. V. S. Evaluation of antioxidant and sensory properties of mango (*Mangifera indica*L.) wine. **CyTA - Journal of Food**, London, v. 10, n. 1, p. 12-20, 2012.

LEBEAU, T.; JOUENE, T.; JUNTER, G. A. Difusion of sugar and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cell. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, n. 6, p. 434-438, May 1998.

LI, H. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, Oxford, v. 112, n. 2, p. 454-460, 2009.

LIU, S. Q.; PILONE, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 49-61, Feb. 2000.

LUCENA, A. P. S. et al. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 23, n. 1, p. 30-36, 2010.

MAGALHÃES, M. M.; BARROS, R. S.; FINGER, F. L. Changer in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 17-22, Mar. 1996.

MAKHOTKINA, O.; PINEAU, B.; KILMARTIN, P. A. Effect of storage temperature on the chemical composition and sensory profile of Sauvignon Blanc wines. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 18, n. 1, p. 91-99, 2012.

MATO, I.; LUQUE, S. S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, Barking, v. 38, n. 10, p. 1175-1188, Dec. 2005.

MIYAKE, T.; SHIBAMOTO, T. Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, n. 11, p. 1968-1970, Nov. 1999.

NERD, A.; MIZRAHI, Y. Reproductive biology of cactus fruit crops. **Horticultural Reviews**, Leuven, v. 18, p. 321-346, 1997.

NESS, A. R.; POWLES, J. W. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. **International Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 1-13, 1997.

NURGEL, C. et al. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on fermentation and flavour compounds of white wines made from cv. Emir grown in Central Anatolia, Turkey. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 29, n. 1, p. 28-33, July 2002.

OLIVEIRA, M. E. S. et al. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, 2011.

PAIXÃO, N. et al. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose´ and white wines. **Food Chemistry**, Oxford, v. 105, n. 1, p. 204-214, 2007.

PEINADO, R. A. et al. Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 21, p. 6389-6393, Oct. 2004.

PEREIRA, M. C. T. et al. Atributos físicos e químicos de frutos de oito clones de jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, p. 16-21, jul. 2000. Número especial.

PERESTRELO, R. et al. Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: identification of the main odorants compounds. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 563, n. 1/2, p. 154-164, Mar. 2006.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Production and characterization of wine from mango fruit (*Mangifera indica L.*). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 8/9, p. 1345-1350, 2005.

REMIZE, F.; SABLAYROLLES, J. M.; DEQUIN, S. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 371-378, 2000.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, Oxford, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.

ROCHA, M. S. et al. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 4, p. 933-941, 2013.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Brasília: EMBRAPA, 2007. 127 p. (Comunicado Técnico).

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Brasília: EMBRAPA, 2006. 125 p. (Comunicado Técnico).

SÁ, L. Z. C. M. de et al. Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of Jaboticaba berry (*Myrciaria jaboticaba*). **Journal of Functional Foods**, New York, v. 8, p. 169-179, May 2014.

SANDHU, D. K.; JOSHI, V. K. Technology, quality and scope of fruit wines especially apple wines. **Indian Food Industry**, Mysore, v. 14, n. 1, p. 24-34, 1995.

SANTOS, C. S. et al. Elaboração e análise sensorial do fermentado de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, p. 47-50, mar. 2005.

STOCLET, J. C. et al. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmaceutical**, New York, v. 500, n. 1/3, p. 299-313, Oct. 2004.

SWIEGERS, J. H. et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 11, n. 2, p. 139-173, 2005.

TORRES NETO, A. B. et al. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 489-492, maio/jun. 2006.

VILLANO, D. et al. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. **Food Chemistry**, Oxford, v. 95, n. 3, p. 394-404, 2006.

VOLSCHENKLA, H.; VUUREN, H. J. J. M. van; VILJOEN-BLOOM, M. Malic acid in wine: origin, function and metabolism during vinification. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 27, n. 2, p. 123-136, 2006.

WANG, J.; MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 15, p. 4183-4189, July 2002.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. In: _____. **Handbook of food analytical chemistry: polyphenolics**. New York: Wiley, 2001. p. 464-465.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 82, p. 84-92, 1976.

WU, L. C. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, London, v. 95, n. 2, p. 319-327, 2006.

YALCIN, S. K.; OZBAS, Y. Z. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 325-332, 2008.

ARTIGO 2

**Immobilised acetic acid bacteria for jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*)
vinegar production**

Artigo submetido segundo as normas da revista International Journal of Food
Science and Technology

ABSTRACT

Fruit surplus is a common result of intensive agriculture in many countries. This ecological and economic problem have need of alternative uses for fruit. The aim of this study was to use surplus jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) fruits to produce vinegar using immobilised acetic acid bacteria. The jaboticaba pulp was processed to produce a jaboticaba wine. *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 was used to ferment jaboticaba must for jaboticaba base wine production. The ethanol content of this base wines was approximately 74.78 g.L⁻¹ (9.5 °GL) after 168 h of fermentation. The acetic fermentation for vinegar production was conducted using a mixed culture of immobilised *Acetobacter aceti* (CCT 0190) and *Gluconobacter oxydans* (CCMA 0350) cells. The yield of acetic acid reached 74.4% and the productivity was 0.29 g.L⁻¹h⁻¹. The amounts of citric (6.67 g.L⁻¹), malic (7.02 g.L⁻¹), and succinic acid (5.60 g.L⁻¹) in the vinegar were particularly high. These organic acids are important for imparting a suitable taste and flavour to vinegar. In conclusion, vinegar could be successfully produced from jaboticaba using yeast and immobilised mixed cultures of *A. aceti* and *G. oxydans* cells. This is the first study using a mixed culture immobilised-cells for vinegar production.

Keywords: Fruit vinegar. Alcoholic fermentation. Acetic fermentation.

1. Introduction

Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg.), which belongs to the Myrtaceae family, is a native fruit from Brazil. It exhibits spontaneous and extensive occurrence in the country from the North (Pará State) to the South (Rio Grande do Sul state) regions. The fruit is a smooth, sub-globular berry that is black-purple when ripe, is 1.6 to 2.2 cm in diameter, and contains 1 to 4 seeds. The peel is thin and very fragile, and the pulp has a white to translucent colour and is sweet and slightly acidic (Andersen and Andersen, 1988; Barros et al., 1996; Magalhães et al., 1996; Donadio, 2009).

The jaboticaba's grape-like character allows it for the production of foods such as wine, juice, jelly, liqueur and potentially vinegar (Cavalcanti et al., 2011). *M. jaboticaba* has also been used in the treatment of various diseases; the peel is commonly used in popular treatments of haemoptysis, asthma, diarrhoea and chronic inflammation of the tonsils (Santos and Meireles, 2009). The fruit of the jaboticaba tree has high tannin, vitamin C and flavonoid contents, particularly in its peel, which indicates a high potential antioxidant capacity and therefore a possible role in the prevention of many diseases related to oxidative stress. In Brazil, local population consumes some of these fruits, but the majority is wasted during harvest due to the high production per tree, the short shelf life of the fresh fruit, and the lack of use of these fruits as processed products (Asquieri et al., 2004).

Although the number of studies of fruit wines (Asquieri et al., 2004; Dias et al., 2007; Duarte et al., 2009; Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2011; Puerari et al., 2012), and fruit vinegars has increased (Ameyapoh et al., 2010; Hidalgo et al. 2010; Su and Chien, 2010; Chirife et al., 2011; Hidalgo et al., 2012), no study has focused on the production of jaboticaba vinegar.

Industrial acetification processes can vary slightly depending on the particular raw material and type of vinegar produced. Vinegar is produced in a

two-step process, firstly an alcoholic fermentation and then an acetification. The use of selected starter cultures is a common practice in the fermented food industry to predict and ensure the quality and reproducibility of the final product (Ribéreau-Gayon et al., 2006). These microbial starters play an important role in controlling the fermentative process (Ayad, 2009). Yeast inoculation has been widely used to obtain a product, including various beverages such as wine (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Fleet, 2008) and beer (Dufour et al., 2003; Hutkins, 2006), with a predictable quality (Hutkins, 2006). In contrast, inoculation for vinegar production has traditionally been limited to the use of the mother of vinegar or to back slopping. In these cases, the product obtained is the result of competition between the microorganisms, specifically the acetic acid bacteria (AAB) present in the undefined starter.

The use of AAB pure cultures to making vinegar from wine and persimmon wine has been tested (Hidalgo et al., 2010; Álvares-Cáliz et al., 2014) and the results were not completely successful. The use of starter cultures in vinegar production is still a challenge due to the high genetic variability of AAB. These studies highlighted the usefulness of using AAB mixed inoculation systems. Cell immobilisation can be defined as the physical confinement or localisation of intact cells to a certain area to preserve the desired catalytic activity. Immobilisation often mimics what occurs naturally when cells grow on surfaces or within natural structures. Many microorganisms possess the ability to adhere to different types of surfaces in nature. Numerous biotechnological processes are facilitated by immobilisation techniques, and therefore, several techniques and support materials have been proposed (Kourkoutas et al., 2001; Guo et al., 2010; Jalili et al., 2010). In this study, lyophilised *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11 cells were used for jabuticaba wine production. Vinegar production was performed by mixed immobilised cells of *A. aceti* and *G.*

oxydans. This is the first study using Ca-alginate bead immobilized acetic acid bacteria to produce jabuticaba vinegar.

2. Materials and Methods

2.1. Jabuticaba pulp processing

The jabuticaba fruits were obtained from a farm in Minas Gerais State, Southeastern region of Brazil. Ripe fruits collected manually from the stem and branches of the jabuticaba tree were washed with water to remove residues. The fruit pulp was extracted manually by mechanical pressure and stored in polystyrene bags (2.0 L) at -20 °C. Samples of the jabuticaba pulp were taken for characterisation of the total soluble solids and pH (AOAC, 2000).

To prepare the jabuticaba must, jabuticaba pulp was defrosted at room temperature. The jabuticaba pulp had an average of 9.2 °Brix (°B) and pH 3.8. The soluble solids were adjusted to 16 °B using sucrose solution. Potassium metabisulphite (0.3 g) was added to the final jabuticaba must (3.0 L) to serve as an antibacterial and antioxidant agent. To facilitate sedimentation of the non-fermentable solids, 1 g.L⁻¹ of bentonite was added to the jabuticaba must (Dias et al., 2007).

2.2. Microorganisms

2.2.1. Yeast

Lyophilised *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 (ex UFLA CA11) (Culture Collection of Agricultural Microbiology, CCMA, Federal University of Lavras, Brazil). cells have been used for production of jabuticaba wine.

UFLA CA11 cells were used at a concentration of 10⁷ cells.mL⁻¹. The yeast cells were previously rehydrated in sterile water at 38 °C for 30 min and then inoculated into the jabuticaba must to perform alcoholic fermentation.

2.2.2. Acetic Acid Bacteria

Vinegar production was performed using a mixture of immobilised *A. aceti* CCT 0190 cells (André Tosello tropical culture collection, Brazil) and *G. oxydans* CCMA 0350 cells (Culture Collection of Agricultural Microbiology, CCMA, Federal University of Lavras, Brazil). 1 mL of acetic acid bacteria stock cells were cultivated in 100 mL of YEP-ethanol broth (g.L⁻¹; yeast extract, 10; bacteriological peptone, 20; ethanol, 60) in Erlenmeyer flasks, incubated for 24-48 hours at 30°C and 100 rpm in an orbital shaker to reach a cell density of 10⁶ CFU.mL⁻¹ and then immobilised in calcium alginate.

2.2.3. Immobilised bacterial cells

Bacterial cells were immobilised in calcium alginate according to the methodology proposed by Oliveira et al. (2011) with modifications. Three-hundred mL of each cell suspension (*A. aceti* and *G. oxydans*), at the concentration of 10⁶ CFU.mL⁻¹, were mixed and 6.0 g of sodium alginate (final concentration of 2% alginate, w/v) was added to the cell suspension. To obtain immobilised cells (Fig. 1), the sodium alginate cell suspension mixture was transferred to Mariotte bottles and homogenised before dripping the suspension into a 0.1 M CaCl₂ solution, leading to the formation of calcium alginate beads containing the bacterial cells. The beads containing both *A. aceti* and *G. oxydans* were used as inoculum of the jabuticaba wine to proceed to the acetification.

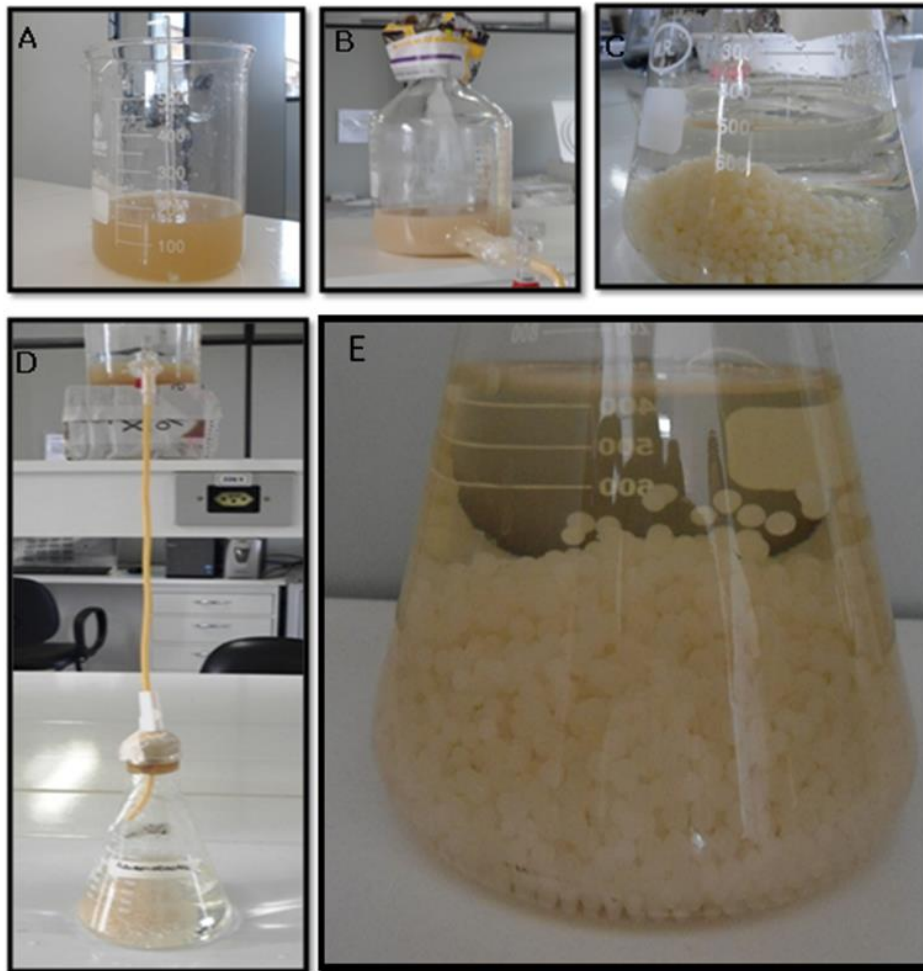


Figure 1 Acetic bacterial cell-immobilisation process. (A) Hydrated sodium alginate; (B) Cell suspension in sodium alginate, (C) Cells suspended in the sodium alginate solution that were added dropwise to the calcium chloride solution to form beads; (D) Immobilisation system; (E) Beads formed

2.3 Vinegar making

The steps involved in vinegar making are shown in Fig. 2

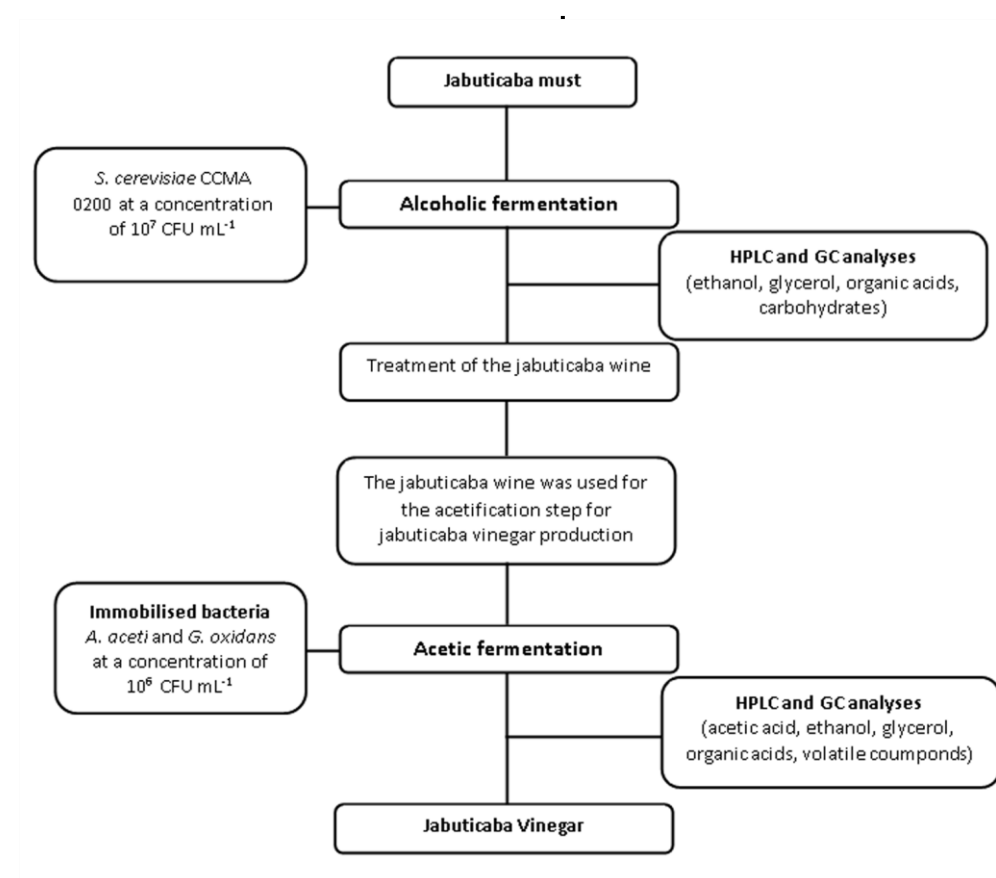


Figure 2 General flowchart of the steps involved in vinegar making

2.3.1 Alcoholic fermentation

The fermentation experiment was conducted in a 5 L glass fermenter, 22°C. The inoculum of *S. cerevisiae* strain was prepared as described in section 2.2.1. The must was inoculated with 10 mL of that suspension, corresponding to a final cell density of 1×10^7 cells.mL⁻¹ in 3.0 L of must. Fermentation was considered finished when the Brix level was stable. CO₂ production was observed during the fermentation process. Samples were taken at the beginning and at the end of fermentation for microbiological and chemical analyses. At the end of fermentation, the glass fermenter was placed in a 10°C incubator to facilitate sedimentation of the solid material in the jabuticaba wine. After 10 days at this temperature, the beverage was transferred to provide aeration and incubated at 10°C for another 30 days. After that period, the jabuticaba wine was then filtered through diatomaceous earth and cellulose filters under vacuum (Dias et al., 2007). The jabuticaba wine was then used for the acetification step for jabuticaba vinegar production.

2.3.2 Acetic fermentation

Immobilised bacterial cells (*A. aceti* and *G. oxydans*) at a concentration of 10^6 CFU.mL⁻¹ were placed in 1.2 L of jabuticaba wine in a 2-L Inceltech LH.SGI Discovery series 100 bioreactor. Approximately 10,980 beads were inoculated into the bioreactor. The pH of the wine was adjusted to 5.0 (by addition of CaCO₃). The oxygen flow was maintained at 0.05 vvm, at 28 °C, without agitation. During the acetic fermentation, samples were taken every 24 hours for subsequent physicochemical and chromatographic analyses. The acetic fermentation was considered complete when the ethanol consumption and acetic acid concentration were stabilized.

2.3.2.1 Viable cells

Viable cells (CFU.mL⁻¹) of total AAB inside the beads was counted at time zero (jaboticaba wine inoculated) and every 24h until the end of vinegar making (264 hours). Ten beads (approximately 0.5 mL of carrier beads) were placed on a glass filter to remove the fluid and then transferred to a 5-mL graduated cylinder containing 3.5 mL of sterilised water. The height of the liquid was recorded to determine the volume increase due to the carrier beads. The immobilised cells were then squeezed out of carrier beads in sterilised water using a glass stick. The number of CFU mL⁻¹ was determined in YEP-ethanol agar (g.L⁻¹; agar, 20; yeast extract, 10; bacteriological peptone, 20; ethanol, 60).

2.4 Physicochemical and chromatographic analysis

The pH values of the alcoholic and acetic fermentations were measured at room temperature using a digital pH meter (Micronal, model B474, Germany). The total soluble solid content was determined using a digital refractometer (ATAGO PR-1000) and results are expressed in degree Brix (°B). The total reducing sugars concentration was determined by dinitrosalicylic acid (DNS) according to the methodology proposed by the (Miller, 1959).

The yield was calculated as the acetic acid produced in relation to the theoretical yield. The theoretical yield was calculated as the amount of ethanol converted to acetic acid, in which 1.0 g of ethanol yields 1.304 g of acetic acid (Park et al., 1989). Productivity was calculated from the quantity of acetic acid produced per unit volume over time (g.L⁻¹ h⁻¹).

The ethanol, glycerol, organic acids (lactic, acetic, tartaric, malic and succinic acid), and carbohydrates (glucose, sucrose and fructose) contents were quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC). The analyses were conducted using a Shimadzu model LC-10 Ai chromatograph (Shimadzu Corp., Japan) equipped with a dual detection system consisting of an ultra violet

detector (UV) and a refractive index detector (RID -10A). A Shimadzu cation-exchange column (Shim-pack SCR-101H, 7.9 mm × 30 cm) was operated at 30 °C for the sugars and ethanol and at 50°C for the organic acids, using 100 mM perchloric acid as the eluent, at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹. The acids were detected via UV absorbance (210 nm), whereas the sugars and ethanol were detected via RID. Individual sugars, acids and alcohols were identified by comparing their retention times with the retention times of certified standards. The quantification of alcohols, sugars and acids was performed using calibration curves obtained using standard compounds. All of the samples were examined in triplicate.

Volatile compounds in the vinegar jabuticaba were analyzed directly without any prior treatment, according to the methods of Duarte et al. (2010b). Analysis was performed using a gas chromatography (GC) Shimadzu model 17A, equipped with an FID (flame ionization detector) and using a capillary column of silica DB Wax (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm) (J&W Scientific, Folsom, Calif., U.S.A.). Operating conditions were as follows: the oven temperature was maintained at 50°C for 5 min, raised to 190 °C by increments of 3°C.min⁻¹ and then kept at 190°C for 10 min. Injector and detector temperatures were kept at 240°C, and the carrier gas (N₂) was kept at a flow rate of 1.2 mL.min⁻¹. Injections of 1 μL were made in the split mode (1:10). The identification of volatile compounds was done by comparing the retention times of the samples with those of standard compounds injected at the same conditions. The quantification of the volatile compounds was expressed as 4-nonanol (125 mg.L⁻¹) as internal standard) equivalents.

2.5 Statistical analyses

Each fermentation process (alcoholic and acetic) was conducted in duplicate and the mean values ± standard deviations are reported. The Tukey's

test was performed using Statgraphics Plus for Windows 4.1 software (Statistical Graphics Corp. Software - (Free download)) to evaluate the statistical significance ($P < 0.05$).

3. Results and Discussion

3.1. Jaboticaba wine

The jaboticaba pulp was processed to obtain a fermentable must. Before the beginning of the fermentative process, sucrose was added to the jaboticaba pulp to achieve 16 °Brix and the must was supplemented with potassium metabisulphite (100 mg.L⁻¹) and bentonite (1 g.L⁻¹). An inoculum of 10⁷ cells/mL (7.0 Log CFU.mL⁻¹) of *S. cerevisiae* UFLA CA11 produced a final ethanol concentration of 75.0 g.L⁻¹ (9.5 °GL), after 168 h of fermentation. These results are differ from those obtained by Duarte et al., (2010a) who reported a value of 57.0 g.L⁻¹ when fermenting jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) with an initial 16 °Brix. Small amounts of sucrose, fructose, and reducing sugars were detected in the jaboticaba wine (0.09 g.L⁻¹, 0.06 g.L⁻¹ and 0.04 g.L⁻¹, respectively). Glucose was not detected in the jaboticaba wine (Table 1). Table 1 presents the contents of compounds that are important with respect to the flavour and the aroma of the jaboticaba wine.

The rapid decrease in the sugar content and increase in the concentration of ethanol during an inoculated fermentation (74.78 g.L⁻¹) was also observed by Domizio et al. (2007) during fermentation of grape must under controlled temperature conditions. This result confirmed that the selected yeast promoted a rapid increase in the concentration of ethanol; moreover, these strains dominate the fermentation process. Nurgel et al. (2002) found that fermentation of non-pasteurised grape using the selected yeast (6.7 log CFU.ml⁻¹) was completed in 6 days, while indigenous fermentation lasted 10 days. These

authors also found that the pH values of the wines were similar (approximately 3.08).

Lactic, tartaric, propionic and butyric acid were not detected in the jabuticaba wine. Acetic acid was formed during the fermentation of jabuticaba must, reaching maximum value of 0.9 g.L^{-1} at 168 h (Table 1). Low concentrations (less than 1.0 g.L^{-1}) of acetic acid provides a pleasant taste and inhibits the development of undesirable or pathogenic microorganisms.

Malic and citric acid were also detected in the jabuticaba wine (Table 1). The malic acid concentration was 1.0 g.L^{-1} at 168 h of fermentation. During the fermentation process, the citric acid concentration decreased from 1.99 g.L^{-1} (0 h) to 1.37 g.L^{-1} at the end of fermentation (168 h). It is possible that citric acid was metabolised by *S. cerevisiae* as a carbon and energy source; which have the ability to ferment/assimilate this organic acid, causing the increase in the pH value (Schwan and Wheals, 2004), as observed in this study. Citric and malic acids are commonly found in fermented fruit beverages, where they act as preservatives with antimicrobial properties (Nurgel et al., 2002; Puerari et al., 2012).

Oxalic acid was detected in the jabuticaba wine before the aerobic phase of acetic fermentation (Table 1). The organic acids produced by yeast and bacterial species contribute to the refreshing flavour, unique aroma and the texture, in addition to controlling the growth of food-spoilage microorganisms (Duarte et al., 2010a). The concentration of glycerol in the jabuticaba wine was low (5.10 g.L^{-1}). This value was consistent with the value of less than 10.0 g.L^{-1} suggested by Dias et al. (2007) to confer the characteristic body and texture of the beverage. Glycerol is the main secondary product of alcoholic fermentations by *S. cerevisiae*, which was used as the inoculum in this study. The glycerol concentration of approximately 5.1 g.L^{-1} was close to the values of 6 and 10 g.L^{-1}

¹ suggested by Vogt et al. (1986) to confer the characteristic body and texture of the beverage.

The ethanol concentration increased during jabuticaba must fermentation, reaching a maximum concentration of 74.78 g.L⁻¹ (10.3% v/v) at 168 h of fermentation (Table 1). Jabuticaba wine was used as base wine for production of jabuticaba vinegar.

3.2. Jabuticaba vinegar

In our study, we used a new technology for vinegar production, which was conducted using a mixture of immobilised *A. aceti* and *G. oxydans* cells in a submerged culture fermentation conducted in a bioreactor.

The experiment was performed under controlled conditions at 28 °C, 0.05 vvm of oxygen, initial pH 5.0 and no stirring. The acetification step was considered finished after consumption of ethanol and acetic acid production have been stabilized, which was observed after 264 h. Analysis of the acetic acid bacterial population showed that the concentration of the mixed immobilised-cell population at the end of vinegar making was 6.7 Log CFU.mL⁻¹ (Fig. 3). The acetic acid concentration in the vinegar reached 77.8 g.L⁻¹ after 264 h. Therefore, the mixed starter culture was found to have efficiently fermented the jabuticaba wine to produce vinegar.

Assessment of the experimental data revealed that using the immobilised-cell model could increase the rate of acetic acid production and substrate utilisation. Encapsulation protected the microorganisms from their environment, and the link between the microbial environment and the production of acetic acid was demonstrated by the model. It can be observed a slight increase in the cell density during the jabuticaba vinegar making (Fig. 3). The model system might have resulted in widespread surface growth and hence, cells could have been continuously released from the gel beads into the

fermentation medium, leading to a decreasing cell population in the beads (Jalili et al., 2010). However, the results showed that a negligible release from the immobilised-cell beads occurred (*data not shown*).

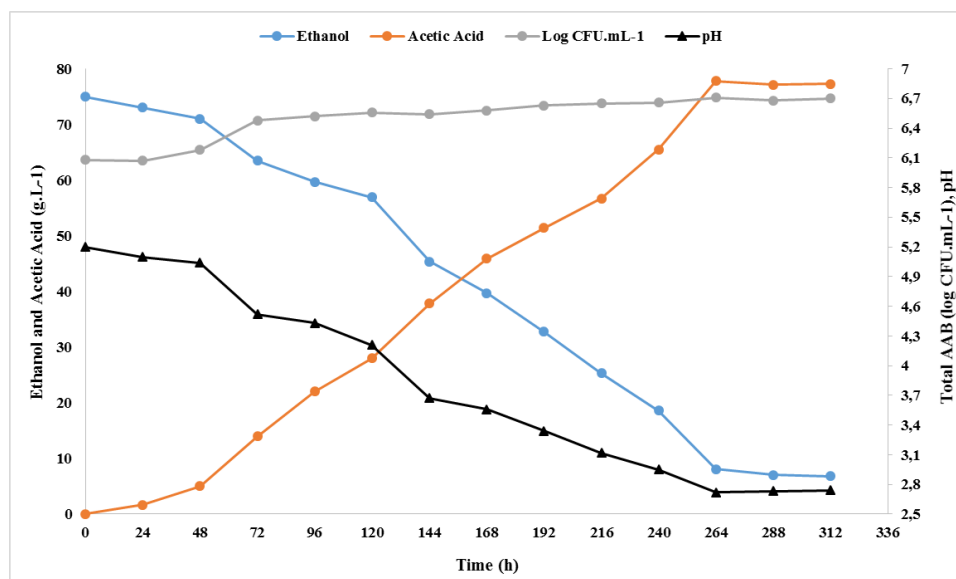


Figure 3 Ethanol consumption, acetic acid production, population of acetic acid bacteria (Log CFU mL⁻¹) and pH value in the jabuticaba alcoholic must during acetic acid fermentation

Ethanol consumptions and acetic acid production during vinegar making can be observed in Figure 3. According to the stoichiometry of reaction that converts ethanol to acetic acid, 1.0 g of ethanol can provide 1.304 g of acetic acid. In industries, the conversion of 1.0 g ethanol to 1.0 g of acetic acid can be considered economic (Maal et al., 2010). Figure 4 shows the yield and productivity of the acetic fermentation. The production was favorable, reaching values of 77.4% yield and productivity of 0.29 g.L⁻¹h⁻¹. Therefore, we can conclude that the evaporation of volatile compounds was low, which might be attributed to using appropriate aeration (0.05 vvm) and thermal (28 °C) conditions.

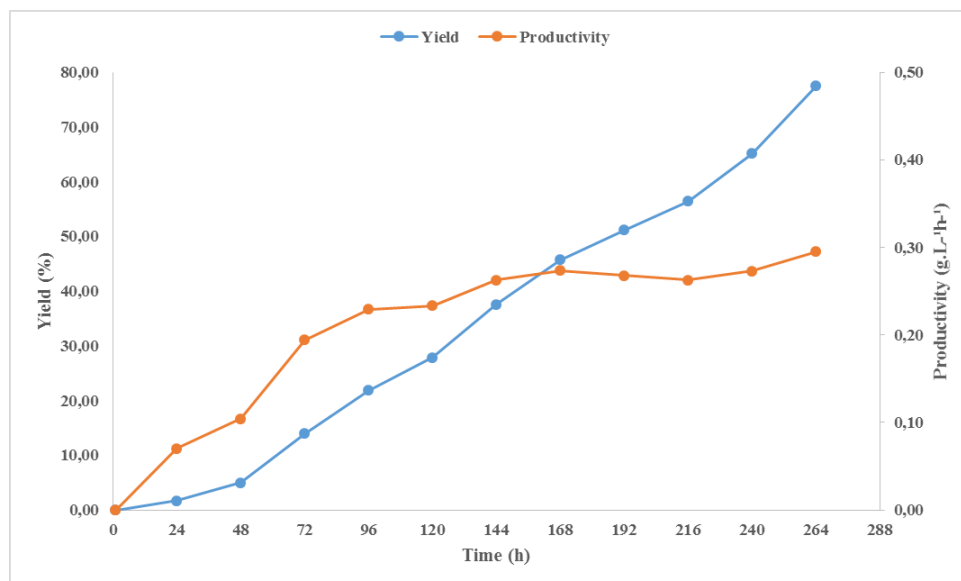


Figure 4 Yield/productivity of acetic acid in the jabuticaba vinegar

Several organic acids in vinegar are important for imparting a suitable taste and flavour. Table 2 shows the contents of various organic acids in the jabuticaba vinegar. The total acetic acid concentration in the jabuticaba vinegar produced using a mixed culture of immobilised *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter oxydans* cells was 77.8 g.L⁻¹ (Fig. 3), which is approximately two times the concentration in onion vinegar (~25.0 g.L⁻¹) produced using cell-free of *A. aceti* (Horiuchi et al., 1999). The mixed culture of immobilised *A. aceti* and *G. oxydans* cells was highly satisfactory for acetic fermentation using jabuticaba wine as the medium. This system achieved higher acetic acid productivity than that of fermentations by free cells. Our results indicated that the mixed culture and immobilised technology might be one of the best fermenting strategies employed to overcome substrate limitation and achieve high product yield. The concentration of citric, malic, and succinic acids were particularly high (Table 2). The contents of these three acids (citric, malic, and succinic) increased by approximately five times compared to the initial values

for the jabuticaba wine. These acids (citric, malic and succinic) were also found by Jang et al., (2015) , in commercial and traditional vinegars from Korea. The lactic, tartaric, butyric and propionic acid concentrations in the jabuticaba wine were null and remained null in the vinegar. The final pH of the jabuticaba vinegar was 2.74. This value is attributed to the high acid production in the fermentation process (Fig. 3).

A total of 18 compounds were identified and quantified in the jabuticaba vinegar, aldehydes, higher alcohol, terpene, acetate, diether, furans, acid, ketones and ethyl esters (Table 3). Callejon et al., (2009) identified in Sherry vinegars ninety-six compounds: 23 carbonyl compounds, 2 ethers, 1 acetal, 26 esters, 3 lactones, 20 alcohols, 6 volatiel phenols, 1 terpeno and 14 acids. The flavor of vinegars is determined by a series of volatile constituents with three different origins: substrate, acetification and aging. Although several major volatile compounds, such as acetic acid, ethyl acetate and acetaldehyde contribute to vinegar's final aroma, many other minor compounds with a wide range of polarities, solubilities and volatilities could help to explain the complexity of the overall sensation, especially if the vinegars are produced from fruits (Ubeda et al., 2011; Plessi; Papotti 2014). Acetaldehyde was the only aldehyde measured in the jabuticaba vinegar (3.72 mg.L^{-1}). Acetaldehyde is a very volatile compound, its content tends to decrease during acetification since this product is an intermediary metabolite in the transformation of ethanol to acetic acid and is therefore converted into acetic acid by the same metabolic pathway (Callejón et al., 2009). At low levels, acetaldehyde gives a pleasant fruity aroma to wines, but at high concentrations, it has a pungent, irritating odour (Miyake, Shibamoto, 1993). Six higher alcohols were identified in Jabuticaba vinegar. Among then, 2-phenylethanol were found in high levels (Table 3). The presence of 2-phenylethanol may cause a “flowery” and “sweet” notes (Perestrelo et al., 2006), which could be considered as a positive

characteristic for Jabuticaba vinegar Acetoin (3-hydroxy-2-butanone) also unique ketone identified in jabuticaba vinegar (149.64 mg.L^{-1}). This compound deriva initially from acetic aldehyde an pyruvates due to the action of microorganisms during alcoholic fermentation ant then from lactate and acetolactate by acetic acid bacteria (AAB) (De Ley, 1959, Plessi; Papotti 2014). Natera et al., (2003) found the content of the acetoin ranging from 18 mg.L^{-1} for malt vinegar to 227 mg.L^{-1} for the apple vinegars. Higher concentrations ethyl acetate and ethyl octanoate were also found in the jabuticaba vinegar, 179.38 and 148.23 mg.L^{-1} , respectively (Table 3). The quantitatively most important volatile ester is ethyl acetate. This is present especially in vinegars produced according to slow acetification surface process, where high amounts of ethanol in conjunction with acetic acid are present, while in the industrial vinegar, the amounts are smaller. Initial ethanol content determines the formation of certain compounds such as ethyl acetate (Morales et al., 2002; Baffo et al., 2009). Ethyl acetate also was by far the major volatile compound found for Callejón et al., (2008), when describe the aroma profile of the different categories of Sherry vinegar, the concentration was between 132 and 3955 mg.L^{-1} , followed by considerable amounts of acetoin 194 and 1020 mg.L^{-1} in all the samples.

Based on the analyses of the vinegar and the limits required by law (Bortolini et al., 2001), the final product of jabuticaba vinegar has an acceptable acetic acid level, of approximately 7.78% (w/v), and an ethanol concentration less than 1.0% (v/v). Figure 5 shows the clear appearance of the jabuticaba vinegar. The final product obtained had a good colour (pale yellow). The jabuticaba vinegar had a strong jabuticaba flavour, which compensated for the pungent smell due to volatile acids, and proved to be a very promising product.

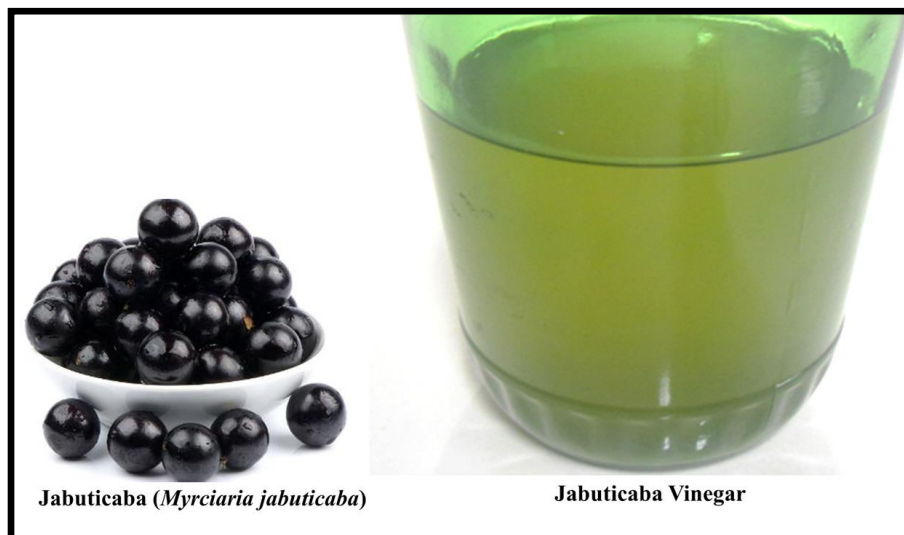


Figure 5 Appearance of jabuticaba fruits and the jabuticaba vinegar

4. Conclusions

Vinegar could be successfully produced from jabuticaba wine using yeast and immobilised cells of mixed cultures of *A. aceti* and *G. oxydans*. This was the first study to produce jabuticaba vinegar. The chemical analyses revealed that jabuticaba vinegar has high contents of organic acids, which add functional value to the vinegar.

The technology proposed in this study is significant because jabuticaba fruits were employed to obtain products of market value, e.g., jabuticaba vinegar. The key point for industrial application of the proposed technology is the promotion of fermentation by an immobilised-cell biomass that provides the possibility of eliminating the use of centrifugal separators, which have a high energy demand and require high industrial investment.

5. Perspectives

This study demonstrated the ability of a mixture of immobilised *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter oxydans* cells to produce jabuticaba vinegar that shows potential for industrial applications. The mixture of immobilised cells is being tested for scalable production of jabuticaba vinegar.

Acknowledgements

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support and scholarships.

References

- Álvarez-Cáliz C, Santos-Duenas I, Garcia-Martínez T, Canete-Rodríguez AM, Millán-Pérez C, Mauricio JC. (2014) Effect of biological ageing of wine on its nitrogen composition for producing high quality vinegar. *Food Bioprod. Process* 92:291-297.
- Andersen O, Andersen, VU. (1988). *As Fruteiras Silvestres Brasileiras*, 2nd ed. Rio de Janeiro, RJ: Globo, 203 p.
- Ameyapoh Y, Leveau JY, Karou SD, Bouix M, Sossou SK, De Souza C. (2010). Vinegar production from Togolese local variety Mangovi of mango *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae). *Pakistan J Biol Scien* 13:132-137.
- AOAC. (2000). *Association of Official Analytical Chemist* 17thed. Washington DC.
- Asquiere ER, Candido MA, Damiani C, Assis EM. (2004). Fabricación de vino blanco y tinto de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg) utilizando la pulpa y la cáscara respectivamente. *Alimentaria* 355:97-109.

- Ayad FH. (2009). Starter culture development for improving safety and quality of Domiati cheese. *Food Microbiol* 26:533-541.
- Barros RS, Finger FL, Magalhães MM. (1996). Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. *Sci Hortic* 66:209–215.
- Boffo EF, Tavares LA, Ferreira M, Ferreira AG. (2009). Classification of Brazilian vinegars according to their ¹H NMR spectra by pattern recognition analysis. *LWT-Food Sci Technol* 42:1455-1460.
- Boidron JN, Chatonnet P, Pons M. (1988). Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaiss Vigne Vin* 22:275-294
- Bortolini F, Santana ES, Coeli R. (2001). Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*); composição dos mostos e métodos de fermentação acética. *Ciência Tecnol Alimentos* 21:236-243.
- Callejón, RM, Morales ML, Ferreira ACS, Troncoso AM. (2008). Defining the typical aroma of Sherry vinegar: sensory and chemical approach. *J Agric Food Chem* 56:8086-8095.
- Callejón RM, Tesfaye W, Torija MJ, Mas A, Troncoso AM, Morales ML. (2009). Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. *Food Chem* 113:1252-1259.
- Campos CR, Silva CF, Dias DR, Basso LC, Amorim HV, Schwan RF. (2010). Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça, in Brazil. *J App Microbiol* 108:1871–1879.
- Cavalcanti RN, Veggi PC, Meireles MAA. (2011). Supercritical fluid extraction with a modifier of antioxidante compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) byproducts: economic viability. *Procedia Food Scien* 1:1672 – 1678.

- Chirife J, Sansiñena M, Galmarini MV, Zamora MC. (2011). Physicochemical changes and sensory characterization of a balsamic vinegar dressing at different °Brix. *Food Bioprocess Technol* 4:1505–1511.
- Czerny M, Christlbauer M, Fischer A, Granvogl M, Hammer M, Hartl C, Hernandez NM, Schieberle P. (2008). Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur Food Res Technol* 228:265–273.
- De Ley J. (1959). On the formation of acetoin by *Acetobacter*. *J Gen Microbiol* 21:352-365.
- Dias DR, Schwan RF, Freire ES, Serôdio R. (2007). Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. *Inter J Food Science Technol (Print)* 42:319-329.
- Domizio P, Lencioni L, Ciani M, Blasi SDI, Pontremolesi C, Sabatelli MP. (2007). Spontaneous and inoculated populations dynamics and their effects on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *Inter J Food Microbiol* 115:281–289.
- Donadio, LC. Jaboticaba: In Santos-Serejo JA, Dantas JLL, Sampaio CV, Coelho YS. (2009). *Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 509 p.
- Duarte WF, Dias DR, Melo GVP, Gervásio IM, Schwan RF. (2009) Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. *J Industrial Microbiol Biotechnol* 36:557-569.
- Duarte WF, Dias DR, Oliveira JM., Teixeira JA, Silva JBA, Schwan RF. (2010a) Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. *LWT - Food Science Technol* 43:1564-1572.

- Duarte WF, Dias DR, Oliveira, JM, Vilanova M, Teixeira JA, Silva JBA; Schwan RF. (2010b). Raspberry (*Rubus idaeus L.*) wine: Yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds. *Food Res Int* 43:2303-2314.
- Duarte WF, Amorim JC, Lago L A, Dias DR, Schwan RF. (2011). Optimization of Fermentation Conditions for Production of the Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) Spirit Using the Response Surface Methodology. *J Food Science* 76:782-790.
- Dufour JP, Verstrepen KJ, Derdelinckx G. (2003). Brewing yeasts. In: Boekhout, T, Robert V (Eds.), *Yeasts Food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 347-388.
- Fleet GH. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Resear* 8:979-995.
- Guo X, Zhou J, Xiao D. (2010). Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from Cheese whey powder solution fermentation. *Applied Biochem Biotechnol* 160:532–538.
- Hidalgo C, Mateo E, Cerezo AB, Torija MJ, Mas A. (2010). Technological process for production of persimmon and strawberry vinegars. *Inter J Wine Resear* 2:55-61.
- Hidalgo C, Mateo E, Mas A, Torija MJ. (2012). Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). *Food Microbiol* 30:98-104.
- Horiuchi JI, Kanno T, Kobayashi M. (1999). New vinegar production from onions. *J Bioscience Bioengineer* 88:107-109.
- Hutkins RW. (2006). Beer fermentation. In: *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, Iowa, pp. 301-347.
- Jalili H, Razavi H, Safari M, Amrane A. (2010). Kinetic analysis and effect of culture medium and coating materials during free and immobilized cell

- cultures of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb 12. *Electronic J Biotechnol* 13:1-10.
- Jang YK, Lee MY, Kim HY, Lee S, Yeo SH, Baek SY, Lee CH. (2015). Comparison of traditional and commercial vinegars based on metabolite profiling and antioxidant activity. *J Microbiol Biotechnol* 25:217-226.
- Kourkoutas Y, Komaitis M, Koutinas AA, Kanellaki M. (2001). Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures. *J Agricultural Food Chem* 49:1417-1425.
- Maal KB, Shafiei R, Kabiri N. (2010). Production of apricot vinegar using an isolated *Acetobacter* strain from Iranian apricot. *Inter J Biological Life Sciences* 6:230-233.
- Magalhães MM, Barros RS, Finger FL. (1996). Changes in structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. *Sci Hortic* 66:17-22.
- Meilgaard MC (1975). Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *MBAA Technical Quarterly*, 12:151-168.
- Miyake T, Shibamoto, T. (1993). Quantitative Analysis of Acetaldehyde in Foods and Beverages. *J Agric Food Chem* 41:1968-1970.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. (1959). *Anal Biochem* 31:426-428.
- Morales ML, Tesfaye W, Garcia-Parrilla C, Casas JÁ, Troncoso AM. (2002). Evolution of the aroma profile of sherry wine vinegars during an experimental aging in wood. *J Agric Food Chem* 50:3173-3178
- Natera R.; Castro R.; García-Moreno Mv.; Hernández Mj, García-Barroso C. (2003). Chemometric studies of vinegars from different raw materials and processes of production. . *J Agric Food Chem*. 51:3345-3351.
- Nurgel C, Erten H, Canbas A, Cabaroglu T, Selli S. (2002). In: Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strain on fermentation and flavor compounds of

- white wines made cv. Emir grown in Central Anatolia, Turkey. *J Industrial Microbiol Biotechnol* 29:28–33.
- Oliveira MES, Pantoja L, Duarte WF, Collela CF, Valarelli LTV, Schwan RF, Dias DR. (2011). Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. *Food Resear Inter*, 44:2391-2400.
- Park YS, Ohtake H, Fukaya M, Okumura H, Kawamura Y, Toda K. (1989). Enhancement of acetic acid production in high cell-density culture of *Acetobacter aceti*. *J Ferment Bioeng* 68:315–319.
- Perestrelo R, Fernandes A, Albuquerque FF, Marques JC, Câmara JS. (2006) Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Anal Chim Acta* 563:154-164.
- Plessi M, Papotti G. (2014). Vinegar. In: Bamforth CW, Ward RE. *The Oxford Handbook of Food Fermentations*. Oxford University Press, Oxford, pp. 345-384.
- Puerari C, Magalhães KT, Schwan RF. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Resear Inter*, 48:634-640.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. (2006). The microbiology of wine and vinifications. In: *Handbook of Enology*, Vol. 1. John Wiley & Sons, Cop, Chichester.
- Romano P, Suzzi G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl Environ Microb* 62:309-315.
- Santos DT, Meireles MAA. (2009). Jabuticaba as a source of functional pigments. *Pharmacognosy Reviews* 3:127-132.
- Schwan RF, Wheals AE. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews Food Science Nutrit* 44:205–222.

- Siebert TE, Smyth HE, Capone DL, Neuwöhner C, Pardon KH, Skouroumounis GK, Herderich MJ, Sefton MA, Pollnitz AP. (2005). Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME–GC–MS. *Anal Bioanal Chem* 381:937–947.
- Su MS, Chien PJ. (2010). Aroma impact components of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) vinegars. *Food Chem* 119:923-928.
- Ubeda C, Callejón RM, Hidalgo C, Torija MJ, Mas A, Troncoso AM, Morales ML. (2011). Determination of major volatile compounds during the production of fruit vinegars by static headspace gas chromatography–mass spectrometry method. *Food Res Int* 44:259-268.
- Vogt E, Jakob L, Lemperle E. (1986). *El vino: obtención, elaboración y análisis*. 2nd edn. Pp. 294. Zaragoza, Spain: Acribia.

Figure captions

Fig. 1. Acetic bacterial cell-immobilisation process. (A) Hydrated sodium alginate; (B) Cell suspension in sodium alginate, (C) Cells suspended in the sodium alginate solution that were added dropwise to the calcium chloride solution to form beads; (D) Immobilisation system; (E) Beads formed

Fig. 2. A general flowchart of the steps involved in vinegar making.

Fig. 3. Acetic acid fermentation. Ethanol consumption and acetic acid production. Concentration of acetic acid bacteria cells (Log CFU mL⁻¹) in the jabuticaba alcoholic must and pH.

Fig. 4. Yield/productivity of acetic acid in the jabuticaba vinegar.

Fig. 5. Appearance of jabuticaba fruits and the jabuticaba vinegar.

Table 1 Chemical and physical characteristics of the jaboticaba wine

Period of fermentation	Acids (gL ⁻¹)				
	Acetic acid	Citric acid	Succinic acid	Malic acid	Oxalic acid
0 h	0.11±0.01a	1.99±0.01a	0.25±0.01a	0.11±0.01a	0.09±0.01a
168 h	0.92±0.01b	1.37±0.01b	1.15±0.01b	1.00±0.02b	0.29±0.01b
Sugars (gL ⁻¹)					
	Sucrose	Glucose	Fructose	Reducing sugars	
0 h	92.60±0.11a	12.60±0.08a	23.47±0.21a	36.46±0.31a	
168 h	0.09±0.01b	n.d.b	0.06±0.01b	0.04±0.01b	
Alcohols (gL ⁻¹)					
	Ethanol	Glycerol			
0 h	n.d.a	n.d.a			
168 h	74.78±0.41b	5.10±0.01b			
	pH	Brix			
0 h	3.05±0.02a	15.5±0.02a			
168 h	3.02±0.02a	5.37±0.02b			

The data are the mean values of duplicate measurements ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$). n.d. = not detected

Table 2 Chemical and physical characteristics of the jabuticaba vinegar

Period of fermentation	Acids (g.L ⁻¹)			
	Citric acid	Succinic acid	Malic acid	Oxalic acid
0 h	1.39±0.01a	1.52±0.01a	1.07±0.01a	0.22±0.01a
264 h	6.67±0.01b	5.60±0.01a	7.02±0.01b	0.18±0.01a
Alcohols (g.L ⁻¹)				
Glycerol				
0 h	5.32±0.01a			
264 h	5.36±0.01a			

The data are the mean values of duplicate measurements ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$). n.d. = not detected

Table 3 Concentration of volatile compounds (mgL⁻¹) identified in Jabuticaba vinegar by GC-FID

N°	Compounds	Concentration (mg.L ⁻¹)	Descriptors
	Aldehydes (1)		
1	Acetaldehyde	3.72	Fresh, green ^a
	Higher alcohol (5)		
2	2-Heptanol	11.48	Coconut, ketonic solvent, unpleasant ^d
3	2-Methyl-1-propanol	7.35	Malty ^a
4	2-Methyl-1-butanol + 3-Methyl-1-butanol	22.21	Malty, solvent-like ^a
5	2-Phenylethanol	31.40	Flowery, honey-like ^a
6	2-Propanol	28.31	--
	Terpene (1)		
7	α -Terpeniol	4.17	Pine, terpenoids ^d
	Acetates (1)		
8	Phenylethyl acetate	1.38	Apple, honey, roses, sweet ^d ; flowery ^b
	Diether (1)		
9	1,1-diethoxyethane	1.63	--
	Furans (1)		
10	Furfuryl alcohol	14.81	--
	Acid (5)		
11	Decanoic acid	2.61	Wax, tallow, rancid, soap ^d ; fatty ^b
12	Isobutyric acid	6.38	Sweat, bitter ^d ; cheese, rancid ^b
13	Hexanoic acid	1.20	Fatty acids, vegetable oil ^d ; cheese, sweaty ^b
14	Propionic acid	2.77	Vinegar ^b
15	Octanoic acid	1.77	Fatty acids, vegetable oil ^d ; rancid, harsh ^b
	Ketones (1)		
16	Acetoin	149.64	Butter, cream, cheese-like ^e
	Ethyl esters (2)		
17	Ethyl acetate	179.38	Solvent, fruity ^d ; nail polish ^c
18	Ethyl octanoate	148,23	Apple, fruity ^d ; sweet ^a

^a Czerny et al. (2008)

^b Siebert et al. (2005)

^c Boidron et al., (1988)

^d Meilgaard (1975)

^e Romano, Suzzi (1996)

< Uso exclusivo do INPI >



Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Sistema de Gestão da Qualidade
 Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	1/3
	Título do Documento:		Código:	Versão:	
Depósito de Pedido de Patente		FQ001		2	
		Procedimento:			

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Diény Ribeiro Dias
 1.2 Qualificação: Farmacêutico - Doutor em Ciências
 1.3 CNPJ/CPF: 85640654600
 1.4 Endereço Completo: DCA, Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG
 1.5 CEP: 37200-000
 1.6 Telefone: (35) 3829-5256 1.7 Fax:
 1.8 E-mail: diasdr@dca.ufla.br

 continua em folha anexa

2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

Processo de obtenção de vinagre de jabuticaba (Myrciaria cauliflora)

 continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão: do pedido Nº** **Data de Depósito:**

5. **Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

 continua em folha anexa

6. Inventor (72):

6.1 Nome: Angélica Cristina de Souza
6.2 Qualificação: Bióloga
6.3 CPF: 07544866645
6.4 Endereço Completo: Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Campus
Universitário, Lavras, MG
6.5 CEP: 37200-000
6.6 Telefone: +55 35 38291613
6.8 E-mail: angelicaunifal@yahoo.com.br

6.1 Nome: Karina Teixeira Magalhães-Guedes
6.2 Qualificação: Bióloga
6.3 CPF: 05012471652
6.4 Endereço Completo: Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Campus
Universitário, Lavras, MG
6.5 CEP: 37200-000
6.6 Telefone: +55 35 38291613
6.8 E-mail: karynamagat@gmail.com

6.1 Nome: Rosane Freitas Schwan
6.2 Qualificação: Agrônoma
6.3 CPF: 65237234704
6.4 Endereço Completo: Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Campus
Universitário, Lavras, MG
6.5 CEP: 37200-000
6.6 Telefone: +55 35 38291614
6.8 E-mail: rschwan@dbi.ufla.br



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	2/3
	Título do Documento:		Código:	Versão:	
Depósito de Pedido de Patente		FQ001		2	
		Procedimento:		DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: Disney Ribeiro Dias

6.2 Qualificação: Farmacêutico

6.3 CPF: 85640654600

6.4 Endereço Completo: DCA, Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.

6.5 CEP: 37200-000

6.6 Telefone: (35) 3829-5256

6.7 FAX:

6.8 E-mail: diasdr@dca.ufla.br

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	3/3
	Título do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		Código:	FQ001
				Versão:	2
				Procedimento:	DIRPA-PQ006

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas);

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	1
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	4
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	1
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) Anexo: Inventor (72) - continuação dos inventores	1

12. Total de folhas anexadas: 10 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Lavras, 27 de fevereiro de 2014

Local e Data

Disney Ribeiro Dias
Assinatura e Carimbo