

1 **EFEITO DA ADIÇÃO DE ENZIMAS PECTINASE E VISCOZYME® L**
2 **DURANTE A ETAPA PRÉ-FERMENTATIVA SOBRE O TEOR DE**
3 **COMPOSTOS BIOATIVOS DE FERMENTADO ALCOÓLICO DE**
4 **JABUTICABA (*Plinia spp.*)**

5

6 Camila Correa Cugnier Machado, Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Carlise Beddin
7 Fritzen Freire e Bruna Rafaela da Silva Monteiro Wanderley.

8

9 **RESUMO**

10

11 A jabuticaba (*Plinia spp.*) é uma fruta originária da Mata Atlântica, de casca roxa escura e polpa
12 clara. É rica em compostos bioativos, tais como as antocianinas, taninos, flavonoides e ácidos
13 fenólicos, com atividades biológicas importantes. No entanto, é uma fruta altamente perecível
14 e esta característica dificulta o seu consumo e comercialização *in natura*, tornando-a
15 subutilizada. Uma alternativa para a valorização deste fruto é a obtenção de bebidas
16 fermentadas através da fermentação alcoólica. Como os compostos bioativos estão presentes na
17 matriz de polímeros da parede celular da jabuticaba, a utilização de enzimas na etapa pré-
18 fermentativa pode auxiliar na liberação destes compostos, tornando os açúcares mais acessíveis
19 para as leveduras durante a fermentação. Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito da
20 adição das enzimas comerciais pectinase e viscozyme® L durante a etapa pré-fermentativa

21 sobre a cor, o teor de compostos fenólicos e antocianinas e atividade antioxidante *in vitro* de
22 fermentados alcoólicos de jabuticaba. O tratamento enzimático influenciou na coloração,
23 aumentou o teor de compostos fenólicos, antocianinas monoméricas totais e atividade
24 antioxidante *in vitro* dos fermentados de jabuticaba em relação ao controle. Sendo que a enzima
25 viscozyme® L apresentou melhor desempenho que a pectinase. A fermentação alcoólica é uma
26 estratégia promissora para a valorização da jabuticaba, transformando-a em um produto de
27 maior valor agregado, ampliando o seu consumo e comercialização.

28 **Palavras-chave:** jabuticaba; compostos bioativos; fermentação alcoólica; enzimas.

29
30 **EFFECT OF THE ADDITION OF PECTINASE AND VISCOZYME® L**
31 **ENZYMES DURING THE STAGE OF PRE-FERMENTATION ON THE**
32 **CONTENT OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN ALCOHOLIC**
33 **FERMENTED OF JABUTICABA (*Plinia* spp.)**

34
35 **ABSTRACT**

36
37 Jabuticaba (*Plinia* spp.) is a fruit originate from the Atlantic Forest, with a purple skin and light
38 pulp. It is rich in bioactive compounds, such as anthocyanins, tannins, flavonoids and phenolic
39 acids, with important biological activities. However, it is a highly perishable fruit and this

40 characteristic makes it difficult to consume and commercialize, making it underutilized. An
41 alternative for valuing this fruit is to obtain fermented drinks through alcoholic fermentation.
42 As bioactive compounds are present in the polymer matrix of the jaboticaba cell wall, the use
43 of enzymes in the pre-fermentation stage can assist in the release of these compounds, making
44 the sugars more accessible to yeast during fermentation. This study explored the use of
45 commercial enzymes pectinase and viscozyme® L in the pre-fermentation stage and revealed
46 that the enzymatic treatment influenced the color, increased the content of phenolic compounds,
47 total monomeric anthocyanins and *in vitro* antioxidant activity of fermented jaboticaba versus
48 control. Thus, alcoholic fermentation is a promising strategy for valuing jaboticaba fruit,
49 transforming it into a product with greater added value, expanding its consumption and
50 commercialization.

51 **Keywords:** jaboticaba; bioactive compounds; alcoholic fermentation; enzymes.

52

53 1 INTRODUÇÃO

54

55 A jaboticabeira é uma árvore frutífera endêmica da América do Sul, originária da Mata
56 Atlântica, cultivada por pequenos agricultores (FERNANDES *et al.*, 2022). Seus frutos
57 apresentam uma casca de coloração roxa escura e uma polpa clara, produzidos principalmente
58 entre os meses de agosto e novembro (INADA *et al.*, 2015).

59 A jaboticaba é altamente nutritiva e rica em compostos bioativos, tais como as
60 antocianinas, taninos, flavonoides e ácidos fenólicos. Estes compostos podem apresentar ação

61 anti-inflamatória, hipoglicemiante, hipolipidêmica e analgésica (FERNANDES *et al.*, 2022).
62 No entanto, é um fruto com alta perecibilidade, com perda de elevado teor de umidade e início
63 do processo de deterioração da polpa em até dois dias após a colheita, com consequentes
64 alterações das características sensoriais, dificultando o seu consumo e comercialização *in*
65 *natura* (VIEITES *et al.*, 2011). Uma estratégia que pode ser utilizada para contornar a
66 problemática de perecibilidade da jabuticaba é a fermentação alcoólica.

67 A jabuticaba possui as características ideais para a fermentação, tendo em vista que
68 possui um alto teor de sólidos solúveis (em média 12,6 °Brix) e baixa acidez (em média 0,55 g
69 ácido cítrico 100 mL⁻¹) (DANNER, 2009). Os compostos bioativos estão presentes
70 principalmente na matriz de polímeros da parede celular da jabuticaba, juntamente com a
71 pectina, hemicelulose, ligninas e proteínas. Esta matriz, por sua vez, engloba microfibrilas de
72 celulose que estão localizadas no interior da parede celular (LIMA, 2002). A indústria tem
73 utilizado enzimas para degradar determinados constituintes da parede celular com o propósito
74 de liberar os compostos bioativos alvo intercelulares com maior facilidade na etapa pré-
75 fermentativa, tornando os açúcares mais acessíveis para as leveduras (ISLAM *et al.*, 2023). De
76 acordo com Islam *et al.* (2023), a utilização de enzimas é vantajosa quando comparada aos
77 métodos convencionais em decorrência da maior capacidade de extração dos compostos de
78 interesse em um menor tempo, bem como da sua compatibilidade com o meio ambiente, e uso
79 reduzido de solvente e energia.

80 Dentre as enzimas comerciais que têm sido utilizadas, destacam-se a pectinase e a
81 viscozyme[®] L. A pectinase hidrolisa a pectina dos frutos, um polissacarídeo estrutural das
82 paredes celulares das plantas constituído de unidades de d-ácido galacturônico conectados por
83 ligação glicosídica α (1,4) (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Assim, a liberação dos
84 polifenóis intercelulares, que fazem parte da estrutura da parede celular pode ser favorecida
85 (ISLAM *et al.*, 2023). Esta enzima é considerada líder no contexto biotecnológico mundial,
86 principalmente pela sua versatilidade, atuação em uma ampla variedade de substâncias pécticas
87 e elevada especificidade de substrato (ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE;
88 DUCHIRON, 2011; PEDROLLI; CARMONA, 2010).

89 A viscozyme[®] L, por sua vez, é um complexo multienzimático que contém arabanase,
90 celulase, β -glucanase, hemicelulase e xilanase. Estas enzimas também hidrolisam componentes
91 da parede celular, como a hemicelulose, celulose e pectina. Conforme o estudo realizado por
92 Islam *et al.* (2023), a viscozyme[®] L obteve um ótimo desempenho com aumento da extração de
93 compostos fenólicos da casca da banana, que foi ainda superior aos resultados obtidos com
94 celulase e pectinase isoladamente.

95 A utilização das enzimas na etapa anterior ao processo de fermentação alcoólica pode
96 propiciar uma melhor extração dos polifenóis, além de um maior rendimento do mosto
97 (UGLIANO, 2009). Ademais, as enzimas diminuem a turbidez e opacidade do mosto,
98 aumentando a limpidez dos produtos e expandindo a vida útil da matéria-prima (OMEJE *et al.*,
99 2023).

100 Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição das enzimas
101 comerciais pectinase e viscozyme® L durante a etapa pré-fermentativa sobre a cor, o teor de
102 compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante *in vitro* de fermentados alcoólicos
103 de jabuticaba (*Plinia spp.*).

104

105 **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

106

107 **2.1 REAGENTES**

108 Os reagentes para análise de capacidade antioxidante *in vitro* (ácido clorídrico, ácido
109 cítrico, cloreto férrico, TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina), álcool etílico, DPPH (2,2-
110 difenil-1- picrilhidrazil), persulfato de potássio) e para a análise de compostos fenólicos totais
111 (reagente de Folin- Ciocalteu e padrão de ácido gálico anidro), bem como as enzimas
112 (Viscozyme® L de *Aspergillus* sp. (≥ 100 U/mL) e a Pectinase de *Aspergillus aculeatus* (≥ 3800
113 U/mL)) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, E.U.A). Os reagentes
114 carbonato de sódio, cloreto de potássio, acetato de sódio e o metabissulfito de potássio foram
115 adquiridos na Neon Comercial (São Paulo, Brasil). A levedura *Saccharomyces bayanus* foi
116 adquirida da Red Star Premier Blanc (Pasteur Champagne). A água ultrapura, utilizada na
117 preparação das soluções, foi obtida através do sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA,
118 E.U.A.).

119

120 2.2 AMOSTRA DO FRUTO

121 As bagas de jabuticaba (*Plinia trunciflora*) foram coletadas em seu estágio cinco de
122 maturação (frutos totalmente maduros) na safra de 2023 no município de Florianópolis (Santa
123 Catarina, Brasil) (27°36'26.1"S 48°30'52.6"W). Após a coleta, os frutos foram higienizados
124 com hipoclorito de sódio (100 mg/L), embalados a vácuo (TM-150, TecMaq, São Paulo, Brasil)
125 e armazenados a -18 °C em freezer.

126

127 2.3 ETAPA PRÉ-FERMENTATIVA

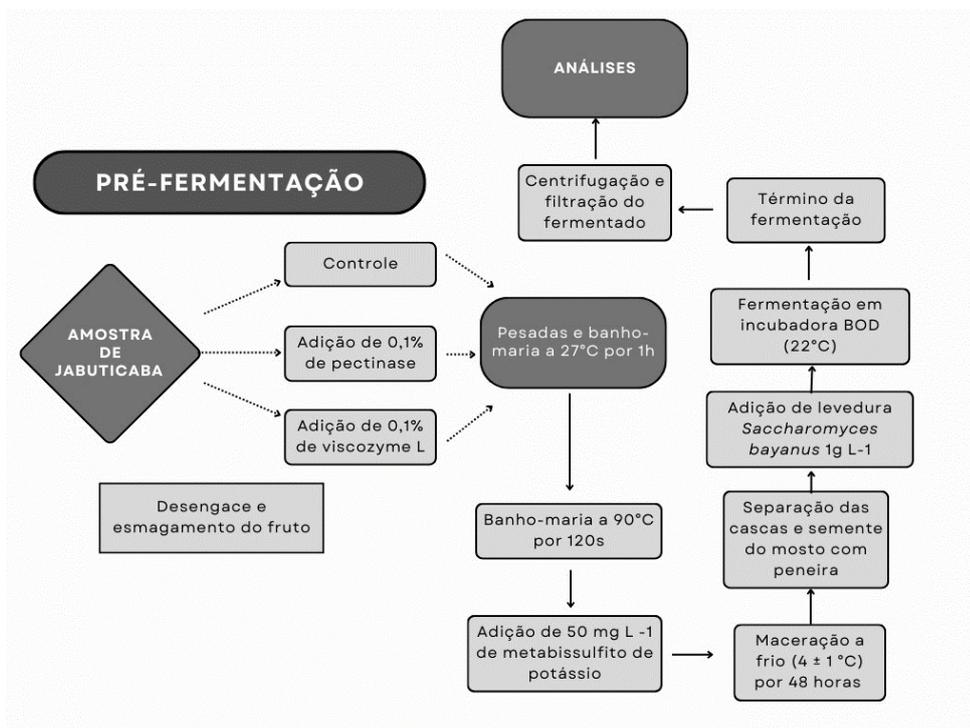
128 A etapa pré-fermentativa foi realizada de acordo com o fluxograma apresentado abaixo
129 (Figura 1) e compreendeu as seguintes etapas: desengace e esmagamento do fruto, seguido de
130 maceração a frio (4 ± 1 °C) por 48 horas (CHEN *et al.*, 2023). Para a maceração foram utilizados
131 três tratamentos: Sem adição de enzimas (AC); com adição de 0,1% de Pectinase (AP); e com
132 0,1% de Viscozyme[®] L (AV). Todos os tratamentos foram realizados em banho-maria
133 (Solidsteel, Piracicaba, Brasil) a 27°C por 1 hora, seguido da inativação enzimática a 92 °C por
134 120 segundos (HORNEDO-ORTEGA *et al.*, 2017). Posteriormente foi adicionado
135 metabissulfito de potássio (50 mg L⁻¹) e as amostras foram encaminhadas para a etapa de
136 maceração a frio, em temperatura de refrigeração. Ao final desse processo, as cascas e sementes
137 dos mostos de jabuticaba foram separadas com o auxílio de uma peneira.

138

139

140

Figura 1- Fluxograma da pré-fermentação e obtenção do fermentado alcoólico de jabuticaba.



141

142

Fonte: elaborado pelo próprio autor (2023).

143

2.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DA JABUTICABA

144

Após a maceração pré-fermentativa os mostos obtidos seguiram para a etapa de

145

fermentação alcoólica (Figura 1), que foi realizada conforme a metodologia proposta por Jiang,

146

Lu e Liu (2020), com modificações. Em todos os tratamentos foram adicionados cultura

147

comercial de levedura *Saccharomyces bayanus* (1 g L⁻¹). A fermentação foi realizada em

148

fermentadores de vidro com capacidade para 250 mL, em uma incubadora BOD (TE-371,

149 Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 22 °C. O processo fermentativo foi acompanhado diariamente por
150 meio de medidas de sólidos solúveis totais e da pesagem dos fermentadores. Ao final, os
151 fermentados foram centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos e filtrados.

152

153 **2.5 ANÁLISE DE COR, PH, ACIDEZ TOTAL, TEOR ALCOÓLICO E DE SÓLIDOS** 154 **SOLÚVEIS DOS FERMENTADOS DE JABUTICABA**

155 As análises de cor dos fermentados foram realizadas utilizando um colorímetro (Minolta
156 Chroma Meter CR-400, Minolta, Osaka, Japão). As leituras foram realizadas em cubeta,
157 obtendo-se os parâmetros L*, a*, b*, C* e h*. O parâmetro L* representa a luminosidade e
158 varia de 0 a 100, o parâmetro a* indica a variação do verde (-a*) ao vermelho (+a*), já o b* a
159 variação do azul (-b*) ao amarelo (+b*). O parâmetro C* expressa a cromaticidade e o h*
160 representa o ângulo da tonalidade (CANUTO *et al.*, 2010). A intensidade de cor e as tonalidades
161 também foram avaliadas por meio da absorção dos fermentados a 420 nm, 520 nm e 620 nm,
162 utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (modelo U-1800, Hitachi, Japão). Para a
163 determinação da intensidade de cor, realizou-se a soma das medidas de absorção a 420, 520 e
164 620 nm. A tonalidade foi definida como a razão das medidas de absorção a 420 nm e 520 nm
165 (LIU *et al.*, 2018). O pH dos fermentados de jabuticaba foram avaliados utilizando um
166 potenciômetro (Tec-7, Tecnal, Piracicaba, Brasil). A acidez total das amostras foi realizada
167 segundo metodologias propostas pela AOAC (2005). O teor de sólidos solúveis totais (SST)
168 dos fermentados de jabuticaba foram avaliados com um refratômetro digital (HI96801, Hanna

169 Instruments, Barueri, Brasil) e expresso em °Brix. Por fim, o teor alcoólico foi feito a partir da
170 metodologia da OIV (2012) e expresso em porcentagem (%).

171

172 **2.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E** 173 **CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DOS FERMENTADOS DE** 174 **JABUTICABA**

175 A determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi realizada através do
176 método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) em espectrofotômetro UV-VIS
177 (modelo U-1800, Hitachi, Japão). Os resultados foram expressos com base em uma curva
178 padrão de ácido gálico ($y = 0,0012x - 0,0481$, $R^2 = 0,992$) em mg por mL. A capacidade
179 antioxidante foi determinada através dos métodos de potencial antioxidante redutor férrico
180 (FRAP) (BENZIE; STRAIN, 1996) e pela capacidade de peroxidação do radical 2,2-difenil-1-
181 picrylhydrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Para ambos os
182 métodos de capacidade antioxidante, os resultados foram expressos com base em uma curva
183 padrão de Trolox ($y=0,0018x + 0,0379$, $R^2=0,993$, $y=0,0757x + 5,0155$, $R^2 = 0,999$, para FRAP
184 e DPPH, respectivamente) em μM por mL.

185

186 **2.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS** 187 **DOS FERMENTADOS DE JABUTICABA**

188 A quantificação das antocianinas monoméricas totais foi realizada através do método
189 diferencial de pH, segundo a metodologia proposta por Giusti e Wrolstad (2001). A reação foi
190 realizada em pH 1,0 e pH 4,5. A leitura foi realizada em 520 e 700 nm em espectrofotômetro
191 UV-VIS (modelo U-1800, Hitachi, Japão). Os resultados foram expressos em mg equivalente
192 de cianidina-3-glicosídeo por mL.

193

194 **2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

195 Todos os métodos supracitados foram realizados em triplicata e os resultados foram
196 expressos em média e desvio padrão. Os resultados obtidos foram analisados por meio da
197 análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey através do *software* OriginPro 2022 (Origin
198 Lab).

199

200 **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

201

202 **3.1 PARÂMETROS DE COR, PH, ACIDEZ TOTAL, TEOR ALCOÓLICO E SÓLIDOS** 203 **SOLÚVEIS TOTAIS DOS FERMENTADOS DE JABUTICABA**

204

205 Os valores de pH, acidez, cor, teor alcoólico e sólidos solúveis totais (SST) dos
206 fermentados alcoólicos de jabuticaba estão apresentados na Tabela 1. Não foi observada
207 diferença entre a acidez total dos fermentados ($p \geq 0,05$). Silva *et al.* (2008) relataram que o

208 fermentado alcoólico de jabuticaba sem adição de enzimas, possui uma tendência a ter uma
209 acidez total elevada em decorrência da alta concentração de ácidos da própria polpa da
210 jabuticaba. Sendo assim, a utilização das enzimas não influenciou na acidez total do fermentado
211 de jabuticaba.

212 Em relação aos SST foi possível observar que o tratamento enzimático também não
213 influenciou significativamente este parâmetro ($p \geq 0,05$). Os sólidos solúveis totais representam
214 em maior parte o teor de açúcares solúveis e ácidos orgânicos (LIMA, 2009). Os fermentados
215 deste estudo apresentaram baixo teor de SST (em torno de 5 °Brix) quando comparado a fruta
216 *in natura*, que tem em média 12,6 °Brix de SST (DANNER, 2009). Esta redução de SST já era
217 esperada, resultado do processo fermentativo, visto que a leveduras *Saccharomyces bayanus*
218 consumiram os açúcares da fruta e transformaram em etanol resultando em um teor alcoólico
219 de aproximadamente 6%.

220 O resultado do teor alcoólico dos fermentados de jabuticaba (aproximadamente 6%),
221 está de acordo com a legislação brasileira, visto que segundo o Decreto n. 6871, de 4 de julho
222 de 2009 o fermentado de fruta deve apresentar uma graduação alcoólica entre 4 e 14 % em
223 volume, a vinte graus Celsius (BRASIL, 2012). Além disso, nota-se que a adição de enzimas
224 não influenciou na porcentagem alcoólica ($p \geq 0,05$).

225 Foi possível observar que os valores de pH dos fermentados obtidos no presente
226 estudo estão de acordo com os valores encontrados em diferentes fermentados alcoólicos de
227 frutas. Ju *et al.* (2023) encontraram uma variação de pH entre 3,0 e 4,0 para vinhos de uva

228 Mascate. Já Chiarelli, Nogueira e Venturini-Filho (2005) observaram o pH em torno de 3,16
229 para fermentados de jabuticaba.

230 O pH é um parâmetro essencial no que tange estabilidade e qualidade sensorial do
231 fermentado, já que está associado à sua vida útil, aroma e cor (FORINO *et al.*, 2020). Além
232 disso, o pH é um fator determinante para as antocianinas e conseqüentemente para a coloração
233 do fermentado, visto que as antocianinas sofrem alterações de cor com mudanças do pH do
234 meio em que se encontram (ARRUDA *et al.*, 2019). Em meio altamente ácido as antocianinas
235 possuem uma coloração avermelhada, tendo em vista que estão na sua forma catiônica (cátion
236 flavílico). Com o aumento gradual de pH, ocorre a desprotonação da antocianina pela formação
237 da base quinoidal e em decorrência disso, a sua descoloração (LIMA, 2009).

238 Grande parte dos agentes clarificadores utilizados na fermentação, como por exemplo,
239 as enzimas comerciais, atuam com maior eficácia em um pH menor do que 3,50 na clarificação
240 e limpidez do produto final (ROTTER, 2008). Assim, os valores de pH encontrados neste
241 estudo são adequados para a atuação das enzimas na limpidez do produto final, bem como
242 condizentes com a natureza da jabuticaba, que possui uma acidez elevada (NEVES, 2016).

243

244

245

246

247
248

Tabela 1- Valores de pH, acidez e parâmetros de cor dos fermentados de jabuticaba

Parâmetros	AC	AP	AV
pH	3,04 ± 0,01 ^a	3,04 ± 0,00 ^a	3,01 ± 0,01 ^b
Acidez total (% ácido cítrico)	13,96 ± 0,81 ^a	14,25 ± 0,41 ^a	14,54 ± 0,82 ^a
SST (°Brix)	5,07 ± 0,15 ^a	5,07 ± 0,21 ^a	4,83 ± 0,73 ^a
Teor Alcoólico (%)	6,0 ± 0 ^a	6,15 ± 0,07 ^a	6,2 ± 0 ^a
L*	27,53 ± 0,01 ^c	31,31 ± 0,04 ^a	30,93 ± 0,01 ^b
a*	17,37 ± 0,01 ^c	28,84 ± 0,01 ^b	32,26 ± 0,11 ^a
b*	8,04 ± 0,03 ^c	16,28 ± 0,02 ^b	21,67 ± 0,09 ^a
C*	19,14 ± 0,01 ^c	33,12 ± 0,02 ^b	38,86 ± 0,04 ^a
h*	24,83 ± 0,08 ^c	29,44 ± 0,03 ^b	33,89 ± 0,20 ^a

249 Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n = 3). ^{a,b,c} Diferentes letras minúsculas na mesma
250 linha indicam diferenças significativas entre as amostras (p < 0,05) para o mesmo método. AC (amostra
251 controle), AP (amostra contendo pectinase) e AV (amostra contendo viscozyme[®]L)

252

253 Os parâmetros de cor dos fermentados de jabuticaba estão apresentados na Tabela 1. Em
254 relação ao parâmetro L*, que representa a luminosidade, o fermentado AP apresentou uma
255 tonalidade mais clara (p ≤ 0,05) do que as amostras AV e AC. O fermentado AV apresentou os
256 maiores valores (p ≤ 0,05) para todos os parâmetros, a*, b*, C* e h*, em relação às amostras
257 AP e AC. Assim, a utilização das enzimas no processo fermentativo contribuiu positivamente
258 para a coloração dos fermentados, com destaque a enzima viscozyme[®]L.

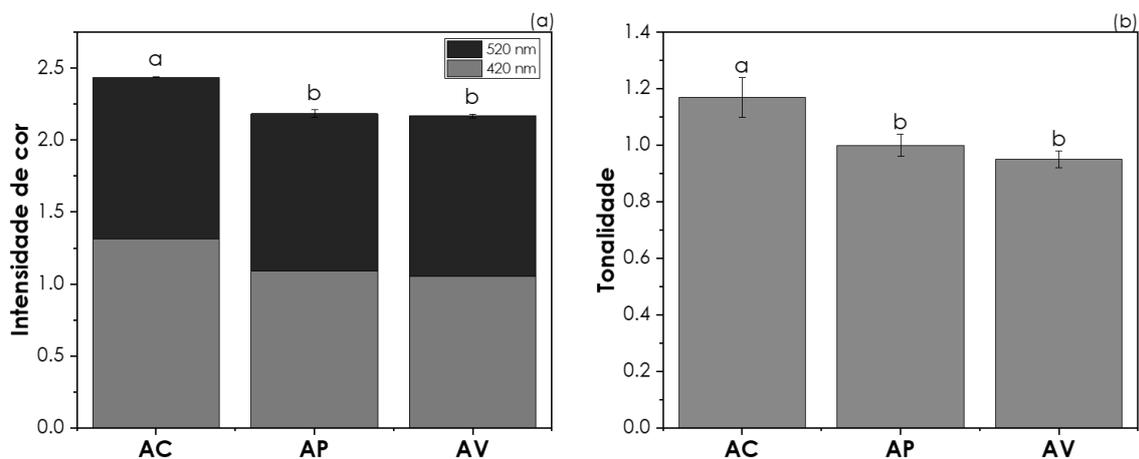
259 O pré-tratamento com enzimas (amostras AP e AV) resultou em valores de intensidade
260 de cor e tonalidade (Figura 2) menores (p ≤ 0,05) do que o observado para a amostra AC. Este
261 mesmo comportamento foi relatado por Jiang *et al.* (2020), que observaram uma redução da

262 intensidade de cor de fermentados de pitaya com adição da enzima pectinase. De acordo com
263 Varo *et al.* (2022), a absorvância em 420 nm indica a presença de tons acastanhados, enquanto
264 que em 520 nm indica tons avermelhados. Desta forma, foi possível observar que a amostra
265 sem adição de enzima apresentou maior intensidade ($p \leq 0,05$) de tons acastanhados, e as
266 amostras pré-tratadas com as enzimas pectinase e viscozyme[®]L apresentaram um equilíbrio
267 entre os tons acastanhados e avermelhados.

268

269 Figura 2 – Intensidade de cor (a) e tonalidade (b) dos fermentados alcoólicos de jabuticaba.

270



271

272

273 Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$). ^{a,b,c} Diferentes letras minúsculas entre colunas
274 indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$) para o mesmo método. AC (amostra controle), AP
275 (amostra contendo pectinase) e AV (amostra contendo viscozyme[®]L)

276

277 A cor de produtos fermentados é uma propriedade determinante na compra do produto
278 final pelo consumidor (WU *et al.*, 2022). Ademais, existe uma correlação entre a cor e o teor
279 de compostos bioativos, sendo as antocianinas os principais compostos responsáveis pela
280 coloração das frutas (MANNINO *et al.*, 2020).

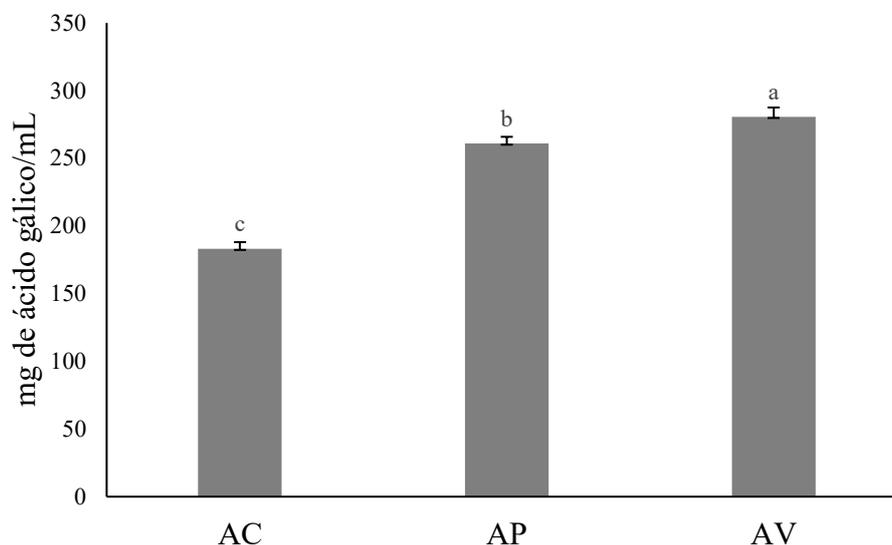
281 282 **3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)** 283 **DOS FERMENTADOS ALCÓOLICOS DE JABUTICABA**

284
285 Na Figura 3 estão apresentados os teores de compostos fenólicos totais (CFT) dos
286 fermentados de jabuticaba. Observou-se que o pré-tratamento enzimático resultou em teores de
287 CFT superiores ($p \leq 0,05$) à amostra controle (AC), com destaque para a amostra AV ($280,78$
288 $\pm 6,74$ mg EAG/mL). A utilização de enzimas na etapa pré-fermentativa tem-se revelado como
289 uma alternativa para aumentar a extração de compostos fenólicos das frutas (MONTELLA *et*
290 *al.*, 2013; PAPILLO *et al.*, 2014). Por exemplo, Jiang *et al.* (2020) relataram que o uso da
291 enzima pectinase no processo de fermentação da pitaya melhorou a extração de compostos
292 fenólicos, com teor de CFT de 275,34 mg EAG/L e 302,83 mg EAG/L, para a amostra controle
293 e para amostra tratada com enzimas, respectivamente. Da mesma forma, Camargo *et al.* (2016)
294 observaram maiores valores de CFT ao utilizar o pré-tratamento com a enzima viscozyme[®]L
295 ($371,0 \pm 7,81$ mg GAE/g base seca) em vinhos de uva em relação a amostra controle
296 ($322,70 \pm 6,79$ mg GAE/g base seca).

297

298
299

Figura 3 - Teor de compostos fenólicos totais dos fermentados de jabuticaba com pré-tratamento enzimático (AP e AV) e sem pré-tratamento (AC)



300
301

302 Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$). ^{a,b,c} Diferentes letras minúsculas na mesma
303 linha indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$) para o mesmo método. AC (amostra
304 controle), AP (amostra contendo pectinase) e AV (amostra contendo viscozyme[®]L)

305
306

307 A extração de compostos fenólicos é dependente da matriz alimentar, da composição do
308 polifenol, das condições aplicadas e das características das enzimas utilizadas (VARO *et al.*,
309 2022). A partir dos resultados apresentados, foi possível observar que o pré-tratamento
310 enzimático, com destaque a enzima viscozyme[®]L, promoveu aumento do teor de compostos
311 fenólicos totais ($p \leq 0,05$) em comparação à amostra controle de fermentado de jabuticaba.
312 Esses resultados são consistentes com pesquisas anteriores, que demonstraram melhores
313 resultados na extração de compostos fenólicos ao utilizar enzimas durante o processo de
314 fermentação alcoólica de frutas, indicando que esta pode ser uma abordagem para

315 potencialização dos compostos antioxidantes do fermentado de jabuticaba (MONTELLA *et al.*,
316 2013; PAPILO *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2020; CAMARGO *et al.*, 2016).

317

318 **3.3 DETERMINAÇÃO DAS ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS**

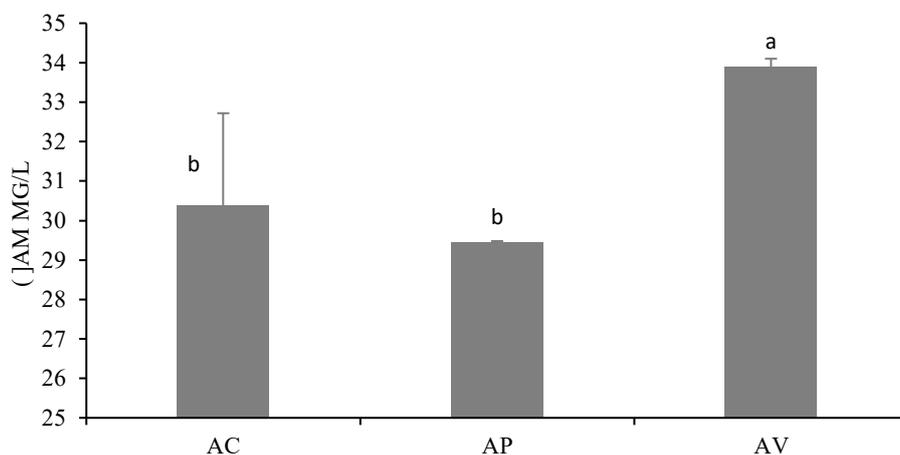
319

320 Os resultados das antocianinas monoméricas totais estão expressos na Figura 4. O
321 fermentado contendo viscozyme[®]L obteve um valor superior significativo de antocianinas
322 ($33,90 \pm 0,20$ AM mg/L), enquanto a amostra contendo pectinase não obteve diferença
323 significativa em relação a amostra controle ($p \leq 0,05$). Este mesmo comportamento foi
324 observado por Nguyen e Nguyen (2018), que relataram que a utilização da enzima viscozyme[®]L
325 em suco de amora aumentou cerca de duas vezes o teor de compostos fenólicos e o teor de
326 antocianinas totais quando comparado ao suco não tratado com enzimas. Adicionalmente,
327 Neves *et al.* (2021) encontraram um valor de antocianinas totais de $35,76 \pm 2,92$ mg/L em
328 fermentados alcoólicos de jabuticaba, resultado semelhante ao encontrado neste estudo.

329 A cor é um dos aspectos mais relevantes dos vinhos e as antocianinas extraídas no
330 processo de fermentação são responsáveis pela coloração avermelhada do produto (HE *et al.*,
331 2012). Ademais, as antocianinas contribuem para as características sensoriais, bem como para
332 a qualidade química do vinho, já que interagem com outros compostos fenólicos, proteínas e
333 polissacarídeos (MAZZA; FRANCIS, 1995).

334 Nesse sentido, o presente estudo indicou que o tratamento enzimático influenciou na
335 concentração de antocianinas totais e conseqüentemente na coloração do fermentado alcoólico
336 de jabuticaba, já que estes dois parâmetros estão correlacionados e são essenciais para qualidade
337 do produto final.

338 Figura 4 - Teor de antocianinas monoméricas totais dos fermentados de jabuticaba com pré-tratamento
339 enzimático (AP e AV) e sem pré-tratamento (AC)



340 Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 3). ^{a,b,c} Diferentes letras minúsculas na mesma
341 linha indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$) para o mesmo método. AC (amostra
342 controle), AP (amostra contendo pectinase) e AV (amostra contendo viscozyme®L)
343

344 3.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

345 A capacidade antioxidante *in vitro* dos fermentados de jabuticaba foi avaliada através dos
346 ensaios DPPH e FRAP (Figura 5). É possível observar que o fermentado AV apresentou os
347 maiores valores de atividade antioxidante ($p \leq 0,05$) em relação a AP e AC para ambos os
348 ensaios realizados. Camargo *et al.* (2016) também encontraram maiores valores de capacidade
349
350

351 antioxidante *in vitro* quando utilizaram a enzima viscozyme®L em vinhos. Islam *et al.* (2023)
352 observaram melhores resultados quando utilizaram a enzima viscozyme® L em comparação à
353 celulase e à pectinase em seu estudo com casca de banana. Essa diferença no desempenho
354 enzimático pode ser explicada pela presença de múltiplas enzimas (xilanase, hemicelulase,
355 arabanase, glucanase e celulase) na viscozyme® L, que hidrolisam os polissacarídeos das
356 paredes celulares e da membrana celular do fruto, liberando os compostos bioativos (VAN;
357 PLETSCHKE, 2012; MEYER; DAM; LÆRKE, 2009).

358

359

360

361

362

363

364

365

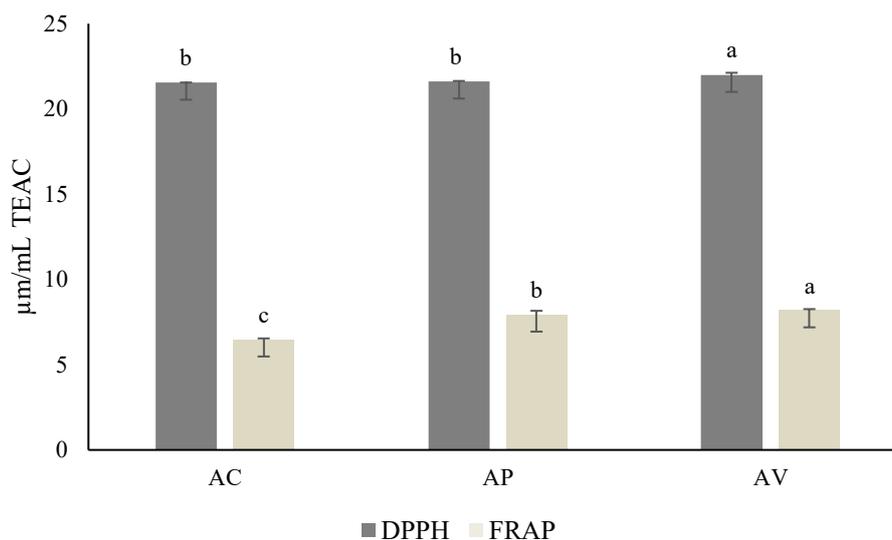
366

367

368

369 Figura 5- Capacidade antioxidante *in vitro* dos fermentados de jabuticaba com pré-tratamento enzimático (AP e
370 AV) e sem pré-tratamento (AC).

371
372



373

374 Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 3). ^{a,b,c} Diferentes letras minúsculas na mesma
375 linha indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$) para o mesmo método. AC (amostra
376 controle), AP (amostra contendo pectinase) e AV (amostra contendo viscozyme[®]L)

377

378 Os valores de atividade antioxidante dos fermentados avaliada por DPPH foram maiores
379 que os valores obtidos pelo método FRAP. Adicionalmente, foi possível observar ainda que o
380 fermentado AP apresentou maior atividade antioxidante do que a amostra controle ($p \leq 0,05$)
381 utilizando o método FRAP, em contrapartida, no ensaio de DPPH, não foram observadas
382 diferenças significativas entre as duas amostras. Segundo Shah e Modi (2015) as discrepâncias
383 entre os métodos de atividade antioxidante podem ser explicadas pela presença de múltiplos
384 antioxidantes nas amostras, que reagem de forma diferente com os reagentes utilizados em cada

385 método. Por este motivo, recomenda-se a utilização de pelo menos dois métodos para a
386 avaliação da capacidade antioxidante (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

387 Neves (2021) relatou que a capacidade antioxidante está diretamente relacionada ao
388 conteúdo de compostos fenólicos totais. Nesse sentido, o presente estudo indicou que o
389 tratamento enzimático, especialmente a enzima viscozyme[®]L, otimizou a extração de
390 compostos fenólicos, de antocianinas totais e de atividade antioxidante *in vitro*.

391

392 **4 CONCLUSÃO**

393

394 O pré-tratamento enzimático tem-se tornado uma estratégia para a indústria de alimentos,
395 na otimização do processo de fermentação e a liberação dos compostos bioativos dos frutos.
396 Este estudo explorou o uso de enzimas comerciais (viscozyme[®]L e pectinase) em fermentados
397 alcoólicos de jabuticaba e apresentou resultados promissores. A adição das enzimas na pré-
398 fermentação influenciou nas características físico-químicas, na coloração do produto final e
399 possibilitou uma melhor extração de compostos fenólicos e de antocianinas monoméricas em
400 relação a amostra controle, contribuindo para aumentar a atividade antioxidante *in vitro* do
401 fermentado alcoólico de jabuticaba. A inclusão de enzimas comerciais, especialmente a
402 viscozyme[®]L, foi uma estratégia promissora no processo fermentativo, destacando seu
403 desempenho superior em relação a pectinase. Sendo assim, essa abordagem sugere que a
404 fermentação alcoólica tem o potencial de superar os desafios da perecibilidade da jabuticaba *in*
405 *natura* prolongando sua vida útil, e acrescentando valor ao fruto regional.

406

407 **5 AGRADECIMENTOS**

408 Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
409 Tecnológico, n.140616/2021-7, n. 305007/2022-0) e a FAPESC (Fundação de Amparo à
410 Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - 2021TR000353) pelo suporte financeiro.
411 Renata D. M. C. Amboni é pesquisadora do CNPq (PQ1D).

412

413 **6 REFERÊNCIAS**

414 ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRON, F. Yeasts: An
415 attractive source of pectinases - From gene expression to potential applications: A review.
416 **Process Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1525-1537, 2011.

417 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC.
418 **Official Methods of Analysis**. 17 ed. Arlington. v. 2, 474p, 2005.

419 ARRUDA, M. R. E., *et al.* Avaliação de extratos de antocianinas como indicadores de pH
420 obtidos por diferentes métodos. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 10, n. 3, p. 87-100,
421 2019.

422 BENZIE, I.; FF; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of
423 “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

424 BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical
425 method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p.
426 25-30, 1995.

427 BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 34,**
428 **de 29 de novembro de 2012.** Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de
429 bebidas fermentas: fermentado de fruta; fermentado de fruta licoroso; fermentado de fruta
430 composto; sidra; hidromel; fermentado de cana; saquê ou sake. Diário Oficial da República
431 Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 nov. 2012.

432 CAMARGO, A. C., *et al.* Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-
433 products: antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. **Food**
434 **Chemistry**, [S.L.], v. 212, p. 395-402, 2016.

435 CANUTO, G. A. B., *et al.* Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e
436 sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p.
437 1196-1205, 2010.

438 CHIARELLI, R. H. C.; NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI-FILHO, W. G. Fermentados de
439 jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg): processos de produção, características físico-químicas
440 e rendimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, 8(4), 277– 282, 2005.

441 DANNER, M. A. **Diagnóstico ecogeográfico e caracterização morfogenética de**
442 **jabuticabeiras.** Dissertação (Mestrado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2009.

443 FERNANDES, I. A. A., *et al.* Bioactive compounds, health-promotion properties and
444 technological applications of jaboticaba: A literature overview. **Measurement: Food**, p.
445 100057, 2022.

446 FORINO, M., *et al.* How must pH affects the level of red wine phenols. **LWT**, [S.L.], v. 129,
447 p. 109546, 2020.

448 GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by
449 UV-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, n. 1, p. F1. 2.1-
450 F1. 2.13, 2001.

451 HE, F., *et al.* Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and
452 their color expression. **Molecules**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 1571-1601, 2012.

453 HORNEDO-ORTEGA, R., *et al.* Influence of fermentation process on the anthocyanin
454 composition of wine and vinegar elaborated from strawberry. **Journal of Food Science**, [S.L.],
455 v. 82, n. 2, p. 364-372, 2017.

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

458 INADA, K. O. P., *et al.* Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in
459 jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions.
460 **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422-433, 2015.

461 ISLAM, M. R. *et al.* Phenolic compounds and antioxidants activity of banana peel extracts:
462 Testing and optimization of enzyme-assisted conditions. **Measurement: Food**, v. 10, p.
463 100085, 2023.

464 JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process**
465 **Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

466 JIANG, X.; LU, Y.; LIU, S. Q. Effects of pectinase treatment on the physicochemical and
467 oenological properties of red dragon fruit wine fermented with *Torulaspota delbrueckii*. **LWT**,
468 v. 132, p. 109929, 2020.

469 JU, Y. L., *et al.* Effects of winemaking techniques on the phenolics, organic acids, and volatile
470 compounds of Muscat wines. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 54, p. 102937, 2023.

471 LIMA, H. C. **Modificações de carboidratos estruturais e de enzimas pécticas em jabuticaba**
472 **[*Plinia trunciflora* (Berg.) Kausel-Myrtaceae]**. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de
473 Lavras, Minas Gerais, 2002.

474 LIMA, A. J. B. **Caracterização e atividade antioxidante da jabuticaba [*Myrciaria cauliflora***
475 **(Mart.) O. Berg]**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, 2009.

476 LIU, S., *et al.* Changes in anthocyanin profile, color, and antioxidant capacity of hawthorn wine
477 (*Crataegus pinnatifida*) during storage by pretreatments. **LWT**, v. 95, p. 179-186, 2018.

478 MANNINO, G., *et al.* Phytochemical profile and antioxidative properties of *Plinia trunciflora*
479 fruits: a new source of nutraceuticals. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 307, p. 125515, 2020.

480 MAZZA, G.; FRANCIS, F. J. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in**
481 **Food Science and Nutrition**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 341-371, 1995.

482 MEYER, A. S.; DAM, B. P.; LÆRKE, H. N. Enzymatic solubilization of a pectinaceous dietary
483 fiber fraction from potato pulp: optimization of the fiber extraction process. **Biochemical**
484 **Engineering Journal**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 106-112, 2009.

485 MONTELLA, R., *et al.* Bioactive compounds from hazelnut skin (*Corylus avellana* L.): Effects
486 on *Lactobacillus plantarum* P17630 and *Lactobacillus crispatus* P17631. **Journal of**
487 **Functional Foods**, 5, 306-315, 2013.

488 NEVES, N. A. **Compostos fitoquímicos e bioativos em diferentes espécies, em licor e**
489 **fermentado de jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (DC) Berg)**. Tese (Doutorado) - Universidade
490 Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

491 NEVES, N. A., *et al.* Identification and quantification of phenolic composition from different
492 species of jaboticaba (*Plinia* spp.) by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, v. 355, p.
493 129605, 2021.

494 NGUYEN, C.; NGUYEN, H. The quality of mulberry juice as affected by enzyme treatments.
495 **Beverages**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 41, 2018.

496 INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE (OIV). **Compendium of**
497 **international methods of wine and must analysis**. Edition 2012., OIV Paris, França, 655 p,
498 2012.

499 OMEJE, K. O., *et al.* Valorization of agro-industrial residues for pectinase production by
500 *Aspergillus aculeatus*: Application in cashew fruit juice clarification. **Cleaner and Circular**
501 **Bioeconomy**, v. 4, p. 100038, 2023.

502 PAPILLO, V. A., *et al.* Release of antioxidant capacity from five plant foods during a multistep
503 enzymatic digestion protocol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, 4119-4126,
504 2014.

505 PEDROLI, D. B; CARMONA, E. C. Purification and characterization of the
506 exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. **Journal of**
507 **Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 567-573, 2010.

508 ROTTER B. *Saccharomyces cerevisiae*. **Asian Journal of Food Agro-Industry**. 008;2:135-9,
509 2008.

510 SHAH, P.; MODI, H. A. Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for
511 determination of antioxidant activity. **International Journal for Research in Applied Science**
512 **and Engineering Technology**, v. 3, n. 6, p. 636-641, 2015.

513 SILVA, P. H. A., *et al.* Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de
514 jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*). **Química Nova**, v.31, n.3, p.595-600, 2008

515 SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-
516 phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p.
517 144-158, 1965.

518 UGLIANO, M. Enzymes in winemaking. **Wine Chemistry and Biochemistry**, p. 103-126,
519 2009.

520 VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using
521 enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting
522 enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

523 VARO, M. A. *et al.* Effect of potassium metabisulphite and potassium bicarbonate on color,
524 phenolic compounds, vitamin C and antioxidant activity of blueberry wine. **LWT**, v. 163, p.
525 113585, 2022.

526 VIEITES, R. L. *et al.* Caracterização físico-química, bioquímica e funcional da jabuticaba
527 armazenada sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 362-
528 375, 2011.

529 WU, Z., *et al.* Color stability enhancement and antioxidation improvement of Sanhua Plum
530 wine under circulating ultrasound. **Foods**, [S.L.], v. 11, n. 16, p. 2435, 2022.