

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PEDRO LUCAS LIRA SOUZA

ELABORAÇÃO DE FERMENTADOS ALCOÓLICOS DE ARAÇÁ-BOI: DO  
PLANEJAMENTO FATORIAL À CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO  
ANTIOXIDANTE

MANAUS

2019

PEDRO LUCAS LIRA SOUZA

ELABORAÇÃO DE FERMENTADOS ALCOÓLICOS DE ARAÇÁ-BOI: DO  
PLANEJAMENTO FATORIAL À CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO  
ANTIOXIDANTE

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pesquisa e Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Orgânica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCOS BATISTA MACHADO

COORIENTADORA: Profa. Dra. JAQUELINE DE ARAÚJO BEZERRA

MANAUS

2019

# FICHA CATALOGRÁFICA

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729e Souza, Pedro Lucas Lira  
Elaboração de fermentados alcoólicos de araçá-boi: do planejamento fatorial à caracterização química e avaliação antioxidante / Pedro Lucas Lira Souza . 2019  
127 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marcos Batista Machado  
Coorientadora: Jaqueline de Araújo Bezerra  
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Eugenia stipitata. 2. Pulcon. 3. Antioxidante. 4. Planejamento fatorial. I. Machado, Marcos Batista. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

PEDRO LUCAS LIRA SOUZA

ELABORAÇÃO DE FERMENTADOS ALCOÓLICOS DE ARAÇÁ-BOI: DO  
PLANEJAMENTO FATORIAL À CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO  
ANTIOXIDANTE

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pesquisa e Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Orgânica.

Aprovado(a) em 18 de outubro de 2019

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Marcos Batista Machado, Presidente

Universidade Federal do Amazonas

---

Dr. Bruno Carius Garrido

Instituto Nacional de Metrologia

---

Prof. Dr. Alan Diego da Conceição Santos

Universidade Federal do Amazonas

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditaram em mim e me apoiaram durante essa jornada. Em especial, a minha querida mãe, Márcia Lira e querido irmão, Iran Lucas.

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço acima de tudo a minha família, principalmente a minha mãe e meu irmão que sempre estiveram ao meu lado, mesmo com os momentos de grande dificuldade pelo qual passamos;
- Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Batista Machado, pela oportunidade de ter realizado esse trabalho. Por todos os ensinamentos. Por ter acreditado em mim mesmo quando nem eu acreditei. Obrigada pela paciência;
- Agradeço a minha coorientadora Profa. Dra. Jaqueline de Araújo Bezerra por todos os ensinamentos e paciência;
- Agradeço a todos os meus amigos, por terem me apoiado nos momentos de fraqueza, em que eu pensei em desistir e me deram animo para continuar: Iran, Larissa, Bianca, Bianka, Lenita, Rafael, Biax, Ellen, Alan, Taline, Jorginho (Lucas), Amadeus, o Chapéu de palha, dentre tantos outros que não lembro os nomes agora. Desculpa;
- Aos meus amigos do Fortnite, obrigada pela força;
- Obrigado aos meus colegas de laboratório, principalmente ao Kidney e a Andrezza que também foram meus grandes mestres, me ensinando coisas que vou levar para a vida toda;
- Ao Prof. Dr. Valdely Ferreira Kinupp por ter concedido os frutos para a produção das bebidas fermentadas;
- À Dra. Lúcia Schuch Boeira por seus ensinamentos para a produção das bebidas fermentadas;
- Aos professores do PPGQ, pelos ensinamentos;
- À CAPES pela bolsa concedida;
- Ao CNPQ, a FAPEAM e à FINEP pelo suporte financeiro destinado ao desenvolvimento deste projeto;
- A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

## EPÍGRAFE

*Um livro, uma caneta,  
uma criança e um professor  
podem mudar o mundo.*

Malala Yousafzai

## RESUMO

O araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) é um fruto não convencional da Amazônia, cuja composição química rica em compostos antioxidantes já foi decrita na literatura. Esse fruto é pouco explorado pela população amazônica, ou mesmo pela indústria de alimentos. Bebidas fermentadas são uma das alternativas para o aproveitamento e valoração destes frutos. Tais bebidas podem ser analisadas de forma qualitativa e quantitativa por meio de técnicas analíticas como a Ressonância Magnética Nuclear – RMN e a Espectrometria de Massas - EM. Diante disso, este trabalho visou realizar um estudo de otimização do processo de produção de bebidas fermentadas de araçá-boi empregando um planejamento fatorial, como também, contribuir com a caracterização química e avaliação das capacidades antioxidantes dos produtos obtidos. Três processos de produção foram realizados. O estágio I consistiu em selecionar duas das variações de levedura com melhor resposta antioxidante (Biolievito Bayanus e Arom Cuvee). O estágio II consistiu na avaliação do processo de filtração, verificando se a filtração interfere nas respostas antioxidantes. Esta triagem resultou em um planejamento fatorial completo de  $2^3$  [fatores: Tipo de levedura (Biolievito Bayanus e Arom Cuvee); Processo (filtração e não-filtração) e a Temperatura (18 °C e 28 °C)]. Os cálculos de efeito do planejamento fatorial revelam que o fator que mais contribui para a resposta antioxidante foi a temperatura, enquanto o tipo de levedura foi o fator menos relevante. As análises por RMN e EM resultaram na identificação de dez substâncias orgânicas (ácidos málico, cítrico, gálico, succínico e fórmico, além de tirosol, sacarose,  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose e etanol). Análises quantitativas por RMN evidenciaram que as maiores concentrações de compostos fenólicos estavam presentes nas bebidas obtidas a temperatura de 28 °C (C28F: 920,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , C28NF: 861,75  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , B28NF: 842,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e B28F: 835,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). O teor alcoólico se manteve entre 11,5 °G.L. e 13,6 °G.L.. A amostra de B18NF foi a que obteve as melhores respostas para os ensaios de DPPH /  $\text{Cl}_{50}$  ( $692,4 \pm 8,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e ABTS ( $1.261,0 \pm 0,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As análises quimiométricas revelaram que as amostras apresentam um perfil químico bastante similar, mas diferem pelas concentrações dos compostos presentes nesses fermentados. Diante disso, este trabalho contribuiu para o desenvolvimento de um processo de produção otimizado de bebidas fermentadas de araçá-boi, assim como a descrição da composição química desses produtos amazônicos.

**Palavras-chave:** *Eugenia stipitata*, PULCON, Antioxidante, Planejamento fatorial.

## ABSTRACT

The araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) is an unconventional fruit from the Amazon, whose chemical composition rich in antioxidant compounds has already been described in the literature. This fruit is little explored by the Amazonian population, or even by the food industry. Fermented beverages are one of the alternatives for the utilization and valuation of these fruits. Such drinks can be analyzed qualitatively and quantitatively by analytical techniques such as Nuclear Magnetic Resonance - NMR and Mass Spectrometry - MS. Therefore, this work aimed to conduct a study of optimization of the production process of fermented beverages of araçá-ox using a factorial design, as well as contribute to the chemical characterization and evaluation of antioxidant capacities of the products obtained. Three production processes were carried out. Stage I consisted of selecting two of the yeast variations with the best antioxidant response (Biolievito Bayanus and Arom Cuvee). Stage II consisted of the evaluation of the filtration process, verifying if the filtration interferes with the antioxidant responses. This screening resulted in a complete factorial design of 23 [factors: Yeast Type (Biolievito Bayanus and Arom Cuvee); Process (filtering and non-filtering) and Temperature (18 °C and 28 °C)]. Factorial design effect calculations reveal that the factor that most contributes to the antioxidant response was temperature, while yeast type was the least relevant factor. NMR and MS analyzes resulted in the identification of ten organic substances (malic, citric, gallic, succinic and formic acids, as well as tyrosol, sucrose,  $\alpha$ -glucose,  $\beta$ -glucose and ethanol). Quantitative NMR analysis showed that the highest concentrations of phenolic compounds were present in the beverages obtained at 28 °C (C28F: 920.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , C28NF: 861.75  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , B28NF: 842.2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and B28F: 835.3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). The alcohol content remained between 11.5 °G.L. and 13.6 °G.L.. The B18NF sample obtained the best response for the DPPH / IC50 (692.4  $\pm$  8.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and ABTS (1,261.0  $\pm$  0.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) assay. 1). The chemometric analyzes revealed that the samples have a very similar chemical profile, but differ by the concentrations of the compounds present in these fermented. Given this, this work contributed to the development of an optimized production process of fermented beverages of araçá-boi, as well as the description of the chemical composition of these Amazonian products.

**Keywords:** *Eugenia stipitata*, PULCON, Antioxidant, Factorial Design.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Frutos de <i>Eugenia uniflora</i> L. Fonte: Centro de Química da Madeira. ....	30
<b>Figura 2.</b> Frutos de <i>Eugenia involucrata</i> DC. Fonte: Google Imagens. ....	31
<b>Figura 3.</b> Frutos de <i>Eugenia dysenterica</i> DC. Fonte: Selos de Fruta. ....	32
<b>Figura 4.</b> Frutos de <i>Eugenia stipitata</i> (Fonte: Lira, A. C). ....	35
<b>Figura 5.</b> (A) Radical livre 2,2-difenil-1picril-hidrazila e (B) Não radical 2,2-difenil-1picril-hidrazina (Fonte: Adaptado de Molyneux, 2011). ....	38
<b>Figura 6.</b> (A) Não radical cátion radical 2,2´azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico e (B) Cátion radical 2,2´azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (Fonte: Adaptado de Schaich, 2015). ....	38
<b>Figura 7.</b> Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu. (A) formação do íon; (B) Reação com molibdênio (Fonte: Adaptado de Oliveira; Valentim; Goulart; Silva et al., 2009). ....	39
<b>Figura 8.</b> Esquema de Design Experimental (Fonte: Adaptado de Narendaran, et al. 2019). ....	40
<b>Figura 9.</b> Esquema de ilustração do fluxo de trabalho metabolômico que combina técnicas avançadas de espectroscopia de RMN e Espectrometria de Massas com estatísticas multivariadas. (I) Análise dos substratos por RMN e EM; (II) Obtenção dos espectros; (III) Análise multivariada dos dados; (IV) Diferenciação e identificação dos metabólitos. ....	43
<b>Figura 10.</b> Diagrama do planejamento fatorial completo adotado para a produção das bebidas fermentadas de araçá-boi. ....	51
<b>Figura 11.</b> Processo de produção dos fermentados alcoólicos de araçá-boi. * = Filtração com Terra, realizada apenas em metade das amostras no estágio II e para a metade das amostras produzidas pelo planejamento fatorial completo. ....	55
<b>Figura 12.</b> Sobreposição dos espectros de RMN <sup>1</sup> H referentes as alíquotas dos fermentados de araçá-boi coletadas coletado das bebidas produzidas no estágio II, no período entre o dia 01 e o dia 11 (11,7 T, D <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O). (A) Tripleto do etanol; (B) Dubleto da sacarose. *Informações complementadas pelos dados quantitativos da tabela 7. ....	64
<b>Figura 13.</b> Sobreposição dos espectros de RMN <sup>1</sup> H (δ 0,00-5,799 ppm) das bebidas fermentadas de araçá-boi, com a sequência de pulsos LC1PNGPPS	

(11,7 T, D <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O). Sinais suprimidos: δ 4,699 ppm (água), δ 3,566 ppm (quarteto do etanol) e δ 1,097 ppm (triplete do etanol). .....	66
<b>Figura 14.</b> Espectro de 1H-RMN das cinco bebidas fermentadas de araçá-boi produzidas no estágio I. (A) Sobreposição dos espectros das cinco bebidas fermentadas; (B) Substâncias identificadas: ácido málico, ácido cítrico e ácido succínico; (C) Substâncias identificadas: Sacarose, α- e β-glicose; (D) Substâncias identificadas: ácido gálico e tirosol (11,7 T, H <sub>2</sub> O / D <sub>2</sub> O). .....	70
<b>Figura 15.</b> Gráfico Biplot (Scores e Loadings) obtidos por PCA (PC1 = 83%; PC2 = 14%) da região de 0,5 a 11,0 ppm das amostras dos oito tipos de bebidas fermentadas obtidas pelo planejamento fatorial. ....	77
<b>Figura 16.</b> Dendograma obtido por HCA da região de 0,5 a 11,0 ppm das amostras dos oito tipos de bebidas fermentadas obtidas pelo planejamento fatorial. ....	78
<b>Figura 17. A.</b> Gráfico Biplot (Scores e Loadings) obtidos por PCA (PC1 67% e PC2 24%); <b>B.</b> dendograma obtido por HCA da região de 0,5 a 11,0 ppm das amostras dos oito tipos de bebidas fermentadas obtidas pelo planejamento fatorial, com temperatura fixada em 18 °C. ....	79
<b>Figura 18.</b> Gráfico Biplot (Scores e Loadings) obtidos por PCA (PC1 93% e PC2 4%); <b>B.</b> dendograma obtido por HCA da região de 0,5 a 11,0 ppm das amostras dos oito tipos de bebidas fermentadas obtidas pelo planejamento fatorial, com temperatura fixada em 28 °C.....	80
<b>Figura 19.</b> Análise dos efeitos absolutos para o planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> ) para a resposta de atividade antioxidante para o ensaio de DPPH (intervalo de confiança 95%). .....	83
<b>Figura 20.</b> Análise dos efeitos absolutos para o planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> ) para a resposta de atividade antioxidante para o ensaio de Fenóis Totais (intervalo de confiança 95%). .....	84
<b>Figura 21.</b> Análise dos efeitos absolutos para o planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> ) para a resposta de atividade antioxidante para o ensaio de ABTS (intervalo de confiança 95%). .....	85
<b>Figura 22.</b> Análise dos efeitos absolutos para o planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> ) para a resposta de atividade antioxidante para a concentração de tirosol (intervalo de confiança 95%). .....	86

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Algumas substâncias identificadas ou isoladas a partir dos frutos de <i>Eugenia</i> spp. ....	25
<b>Quadro 2.</b> Composição centesimal da polpa dos frutos de <i>Eugenia stipitata</i> ..	34
<b>Quadro 3.</b> Tipos de ensaios antioxidantes baseados em HAT e ET. ....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Códigos de leveduras comerciais e o processo avaliado nos estágios I e II.....	50
<b>Tabela 2.</b> Sistema de aleatorização adotado para realizar as análises, de acordo com o planejamento fatorial completo de $2^3$ .....	52
<b>Tabela 3.</b> Tabela de avaliação da análise preferencial. ....	56
<b>Tabela 4.</b> Valores médios da análise preferencial das bebidas fermentadas de araçá-boi.....	65
<b>Tabela 5.</b> Dados espectrométricos das bebidas fermentadas de araçá-boi (11,7 T, H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O).....	68
<b>Tabela 6.</b> Concentração de ácido gálico e tirosol nas bebidas fermentadas de araçá-boi por RMNq.....	71
<b>Tabela 7.</b> Dados quantitativos por RMNq de $\alpha$ -glicose, $\beta$ -glicose e etanol das bebidas de araçá-boi durante a fermentação. ....	72
<b>Tabela 8.</b> Tabela de concentrações do tirosol e etanol das amostras provenientes do planejamento fatorial completo. ....	73
<b>Tabela 9.</b> Atividade antioxidante das bebidas fermentadas de frutos de araçá-boi obtidas no estágio I de produção. ....	75
<b>Tabela 10.</b> Atividade antioxidante das bebidas fermentadas de frutos de araçá-boi obtidas por meio do planejamento fatorial completo.....	76
<b>Tabela 11.</b> Contribuição individual dos fatores e suas interações na resposta antioxidante.....	82
<b>Tabela 12.</b> Contribuição individual dos fatores e suas interações nas concentrações de tirosol nas bebidas fermentadas.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS:** (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinaq-6-ácido sulfônico))
- ANOVA:** Análise de Variância
- D.B.O.:** Demanda Bioquímica de Oxigênio
- CFT:** Conteúdo de Fenois Totais
- CG:** Cromatografia Gasosa
- CL:** Cromatografia Líquida
- CLAE:** Cromatografia Líquida de alta eficiência
- CLUE:** Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
- DesvPad:** Desvio Padrão
- DPPH:** 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
- d:** Dupleto
- dd:** Duplo dubleto
- ddd:** Duplo duplo dubleto
- DIC:** Detector de Ionização em Chama
- DOE:** *Design of Experiment*
- EM:** Espectrometria de Massas
- ERETIC:** *Electronic Reference To access In vivo Concentrations*
- ESI:** *Electro Spray Ionization*
- ET:** *Electron Transfer*
- FAO:** *Food and Agriculture Organization*
- FRAP:** *Ferric Reducing Antioxidant Power*
- FT:** Fenois Totais
- HAT:** *Hydrogen Atom Transfer*
- HMBC:** *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
- HMDB:** *The Human Metabolome Database*
- HSQC:** *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
- COSY:** *Correlation Spectroscopy*
- HCA:** *Hierarchical Cluster Analysis*
- IC50:** *Half Maximal Inhibitory Concentration*
- J:** Constante de acoplamento
- LD:** Limite de Detecção
- MLG:** Modelo Linear Generalizado

**m:** *Multipleto*

**m/z:** Relação massa/carga

**OBA:** *Optimized Bucketing Algorithm*

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PANC:** Plantas Alimentícias Não Convencionais

**PCA:** *Principal Components Analysis*

**PF** Peso Fresco

**pH:** potencial Hidrogeniônico

**ppm:** *parte por milhão*

**PULCON:** *Pulse Length-based Concentration determination*

**q:** Quarteto

**RMN:** Ressonância Magnética Nuclear

**RMNq:** Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa

**s:** Simpleto

**SST:** Sólidos Solúveis Totais

**t:** *Tripleto*

**TF:** Transformada de Fourier

**TMSP-d<sub>4</sub>:** *Trimethylsilylpropanoic Acid*

**[M - H]<sup>-</sup>:** Molécula desprotonada

## LISTA DE SÍMBOLOS

**$\delta$** : Deslocamento Químico

**$\Delta\delta$** : Variação de Descolamento Químico

**$T_1$** : Tempo de Relaxação Longitudinal

**$T_2$** : Tempo de Relaxação Transversal

**$cS$** : Constante de Proporcionalidade

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	18
2.	OBJETIVOS.....	20
2.1.	Objetivo Geral .....	20
2.2.	Objetivos Específicos .....	20
3.	REVISÃO DA LITERATURA .....	21
3.1.	Bebidas fermentadas de frutos .....	21
3.2.	Frutos do gênero <i>Eugenia</i> .....	24
3.2.1	O fruto de <i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh .....	32
3.3.	Análise dos Potenciais Antioxidantes .....	36
3.3.1.	Ensaio para avaliação dos Potenciais Antioxidantes .....	36
3.4.	Aplicação de Planejamento experimental na Otimização de Experimentos .....	39
3.5.	Análises de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas nos estudos de Metabolômica .....	41
3.5.1.	Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq).....	43
3.5.2.	O método de quantificação ERETIC .....	45
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
4.1.	Coleta dos frutos.....	48
4.2.	Produção das Bebidas Fermentadas da primeira etapa: Análise das variáveis.....	48
4.2.2.	Produção das Bebidas Fermentadas: Aplicação do planejamento fatorial completo para a segunda etapa de produção das bebidas.....	53
4.3.	Ensaio para a avaliação dos Potenciais Antioxidantes.....	57
4.3.1.	Ensaio de capacidade sequestrante do radical DPPH· .....	57
4.3.2.	Ensaio de capacidade sequestrante do cátion radical ABTS <sup>+</sup> .....	57
4.3.3.	Ensaio para Determinação de Fenóis Totais .....	58

4.4. Identificação estrutural dos constituintes químicos das Bebidas Fermentadas .....	59
4.4.2. Análise por Espectrometria de Massas .....	61
4.5. Análises Univariadas e Multivariadas .....	61
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	63
5.1. Seleção das bebidas e análise do processo de fermentação .....	63
Aroma .....	65
5.2. Identificação dos constituintes por RMN .....	66
5.3. Quantificação por RMN.....	71
5.4. Resultados dos Ensaio Antioxidantes .....	74
5.5. Análises Quimiométricas dos Dados .....	76
6. CONCLUSÃO .....	87
7. REFERÊNCIAS.....	89
1. APÊNDICES .....	104

## 1. INTRODUÇÃO

A flora amazônica tem se mostrado uma imensa fonte de recursos naturais, principalmente no que se diz respeito a suas espécies frutíferas. Alguns frutos, tais como o açaí, o buriti e o cupuaçu já são bastante conhecidos da região e até mesmo internacionalmente, devido a sua exploração e manejo, possibilitando a produção de derivados alimentícios, como geleias, sucos, cremes e fermentados (Moreira e Malavolta, 2004; Pessoa, 2012; Virapongse *et al.*, 2017, Boeira *et al.*, 2020). No entanto, o aumento da demanda por tais produtos, somada a frequente busca por alimentos que possam agregar benefícios a saúde, tanto do ponto de vista antioxidante como do nutracêutico, culminam para que outros frutos da região que ainda são pouco populares possam ser explorados. Nesse contexto, as PANC (Plantas Alimentícias Não Convencionais) surgem como potenciais substratos viabilizando novos produtos alimentícios, como os exemplos a pitanga (*Eugenia uniflora* L.), o araçá-pera (*Psidium acutangulum*) e o araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) (Kinupp, 2014), todos pertencetes à família Myrtaceae

Sabe-se que a química deste fruto já é algo descrito na literatura, sendo diversificada em flavonoides, carotenoides, ácidos orgânicos, entre outros compostos que agregam-no potenciais antioxidante e nutracêutico, tornando-o um interessante objeto de estudo, principalmente, nas áreas medicinal, farmacêutica, de alimentos e produtos naturais (Genovese *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2010).

Compostos fenólicos, carotenoides e ácidos graxos são os principais responsáveis pelas capacidades antioxidante e/ou nutracêutica, comumente manifestadas nos frutos de Myrtaceae, sendo estes de grande interesse para as indústrias de alimentos, que utilizam os frutos como matéria prima, visto que tais características agregam ainda mais valor aos seus produtos derivados alimentícios (Genovese *et al.*, 2008; Garzon *et al.*, 2012).

A utilização de frutos para obtenção de produtos alimentícios é uma prática comum nos laboratórios de alimentos. Uma das técnicas empregadas para geração de novos produtos é a fermentação alcoólica. Essa técnica baseia-se,

resumidamente, na ação de leveduras (seres heterotróficos), que se alimentam de matéria orgânica presente no ambiente em que habitam (Tortora *et al.*, 2012). Os tipos de fermentados podem variar de acordo com alguns parâmetros, como a espécie de levedura, o tempo de fermentação, densidade, pH, temperatura de fermentação e concentração do substrato (Samson, 2017). O processo fermentativo proporciona o melhoramento da digestibilidade e a biodisponibilidade de nutrientes e componentes bioativos encontrados no produto (Gumienna, 2016). No entanto, tal processo pode acarretar modificações nas propriedades químicas, físico-químicas, organolépticas previamente conhecidas dos frutos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Otimizar os fermentados alcoólicos dos frutos de araçá-boi a partir de um planejamento fatorial completo, bem como caracterizar a química e avaliar suas capacidades antioxidantes.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Obter fermentados alcoólicos dos frutos de araçá-boi;
- Determinar os parâmetros físico-químicos (pH, densidade, sólidos solúveis, teor de alcoólico) dos produtos fermentados de araçá-boi;
- Identificar os constituintes químicos presentes nas bebidas fermentadas elaboradas a partir dos frutos de araçá-boi por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas;
- Quantificar os constituintes majoritários presentes nas bebidas fermentadas a partir de araçá-boi por RMN;
- Analisar as capacidades antioxidantes por ensaios químicos (DPPH, ABTS, Fenois Totais) dos produtos fermentados de frutos de araçá-boi.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

Os frutos de *Eugenia stipitata* (araçá-boi) apresentam uma variedade química que lhes atribuem propriedades antioxidantes e nutracêuticas (Gonçalves *et al.*, 2010). Tais propriedades podem sofrer modificações quando o fruto é submetido à fermentação alcoólica. A utilização de técnicas analíticas como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (EM) surge como uma alternativa na determinação do perfil químico de matrizes complexas (como bebidas fermentadas alcoólicas), fornecendo informações qualitativas e quantitativas ao longo do processo fermentativo.

#### 3.1. Bebidas fermentadas de frutos

A fermentação é um método muito eficaz de biopreservação de produtos alimentares (melhorias no valor nutricional do produto fermentado, incluindo a remoção ou melhoria de substâncias tóxicas presentes na matriz de partida), como também um meio de desenvolver novos produtos a partir de matrizes conhecidas, modificando as propriedades químicas, físico-químicas, organolépticas do produto final, o que reflete em algumas alterações, tais como sabor, aroma e textura (Wood, 1991; Gumienna *et al.*, 2016).

Nesse contexto, destacam-se como produtos de fermentação as bebidas alcoólicas, ou bebidas fermentadas, como por exemplo, os vinhos (fermentados exclusivo de uvas), que além de apresentarem uma composição química rica em compostos antioxidantes, apresentam também relevância com relação ao aspecto social, pois esta é umas das principais formas de desenvolvimento social sustentável em muitas regiões do globo, particularmente nas zonas rurais (Barisan *et al.*, 2019).

As bebidas podem ser classificadas como bebidas fermentadas se forem produzidas de um único fruto, ou fermentado misto, quando houver a presença de outros frutos (Oliveira, 2015). No entanto, não podem ser chamadas de vinho, pois essa denominação se dá somente para bebidas elaboradas a partir de uvas

frescas e sãs, de acordo com a Lei 7.678 de 8 de novembro de 1988 que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho (Brasil, 1988).

De acordo com a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, fermentado de fruta é a bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento (14%) em volume, a vinte graus Celsius, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura (Brasil, 1994). O fermentado de fruta pode ser adicionado de açúcares, água e outras substâncias previstas em ato administrativo complementar, para cada tipo de fruta (Brasil, 1994).

A busca crescente por alimentos e bebidas que possam agregar a saúde tanto em propriedades antioxidantes, quanto nutracêuticas tem encorajado a produção de bebidas fermentadas provenientes de matrizes (frutos) alternativos a tradicional uva.

Oliveira e colaboradores (2011) elaboraram a uma bebida fermentada a partir do fruto de cagaita (*E. dysenterica* DC), em que foram comparadas as fermentações realizadas com células livres e com células imobilizadas de Ca-alginato, testando duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (UFLA CA11 e CAT-1). A mesma levedura foi utilizada por Souza e colaboradores (2015) ao elaborar bebidas fermentadas de diferentes frutas, como a própria cagaita (*E. dysenterica*) e a jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*).

Fermentados de araçá-boi (*E. stipitata* Mc Vaugh) foram produzidos e avaliados quanto as suas características físico-químicas e sensoriais, com três formulações variando as concentrações de açúcares (8, 10 e 15 °Brix, respectivamente) e adicionando 3 g L<sup>-1</sup> da cepa de levedura de panificação liofilizada *S. cerevisiae* (Ferreira, 2014). No trabalho de Moura e colaboradores (2011), onde também foi produzido fermentado do fruto de araçá-boi com a levedura comercial, a análise do mosto do fruto foi feita quanto à acidez titulável, pH e açúcares redutores totais, sendo inoculado com 0,7 % de levedura, por um período de 11 dias a 24 °C, com monitoramento diário do teor de sólidos solúveis e a temperatura do mosto em fermentação.

A obtenção de fermentados a partir de frutas oriundas de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) ainda é uma prática pouco comum e precisa ser

melhor explorada, buscando não somente o aumento da qualidade de produção dos fermentados, como também uma maior valorização dos frutos exóticos (Kinupp, 2014).

Desta forma, estudos que viabilizam a otimização de parâmetros de produção, tais como, o tipo de levedura, o tempo de fermentação, a concentração do substrato, o pH, a temperatura e o processo de filtração são triviais para a obtenção de produtos fermentados de alta qualidade, que atendam às exigências gustativas, nutricionais dos consumidores. Tais estudos também agregam valor e aumentam a popularidade dos frutos provenientes das PANCs, tornando-os objetos de interesse para a pesquisa nas mais diversas áreas, tais como Química de Alimentos e Bebidas e Engenharia de Alimentos.

Nesse contexto, os grupo de pesquisa NEQUIMA (Núcleo de Estudos Químicos de Micromoléculas da Amazônia) da UFAM e NIPA (Segurança Alimentar e Nutricional - Núcleo Integrado de Pesquisa na Amazônia) do IFAM sob a liderança dos pesquisadores Marcos B. Machado e Lúcia S. Boeira tem se interessado em desenvolver novos fermentados a partir de PANCs, com destaque, para as espécies da família Myrtaceae, especialmente as espécies frutíferas pertencentes ao gênero *Eugenia*.

### 3.2. Frutos do gênero *Eugenia*

Myrtaceae é uma família de plantas que compreende cerca de 140 gêneros com aproximadamente 5.800 espécies nativas de regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente na América do Sul, Sudeste da Ásia e Austrália (Romagnolo *et al.*, 2006; Stefanello *et al.*, 2011; Magina *et al.*, 2012). É reconhecida como a oitava maior família de plantas com flores e apresenta vários gêneros de relevância ecológica e econômica em todo o mundo (Grattapaglia *et al.*, 2012). Dentre estes, um dos mais conhecidos e estudados é o gênero *Eugenia*.

O gênero *Eugenia* é um dos maiores de Myrtaceae, constituído por aproximadamente um milhão de espécies, das quais cerca de 400 podem ser encontradas no Brasil, sendo aproximadamente 300 espécies endêmicas. Na América do Sul, o gênero *Eugenia* distribuiu-se desde a parte do Norte do Brasil, onde ocorrem mais de 100 espécies até o norte e o nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai, sendo classificadas como arbustos, árvores e subarbustos (Sobral, 2015).

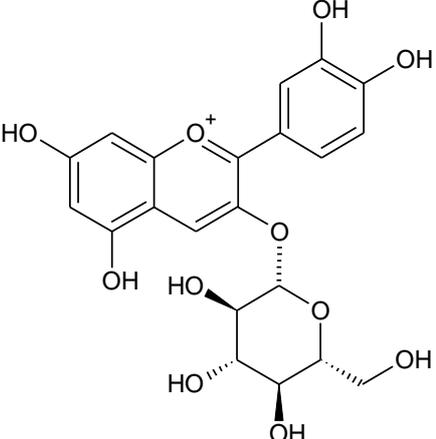
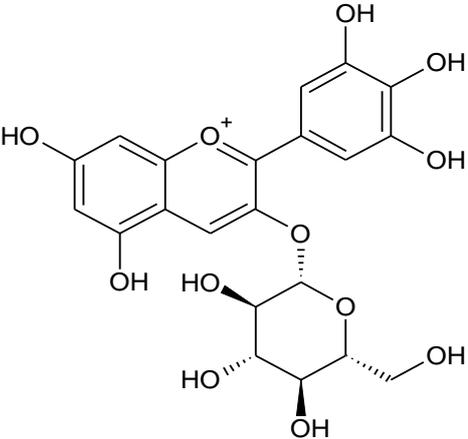
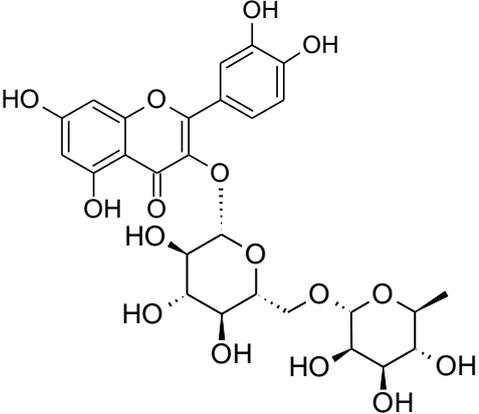
Na Amazônia, o gênero *Eugenia* pode ser encontrado com um elevado número de espécies frutíferas, o que resulta em uma complexa composição devido à sua variedade em substâncias químicas como compostos fenólicos, flavonoides e taninos, além de substâncias terpênicas e seus derivados (Neves, 2017).

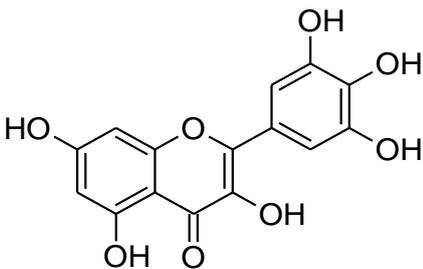
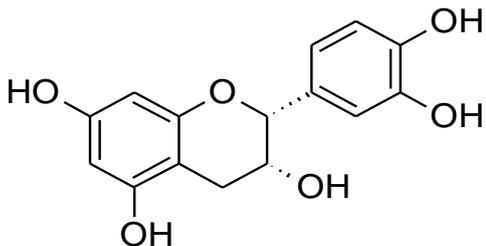
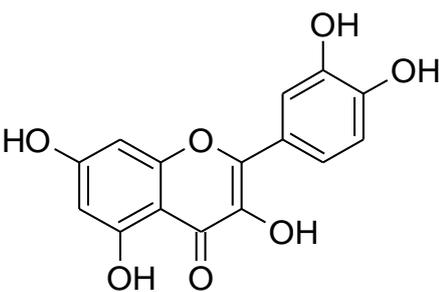
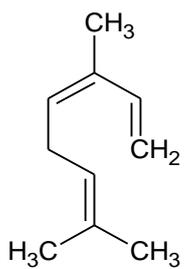
As espécies deste gênero têm um vasto potencial econômico e farmacológico evidenciado, não só pelo número de publicações científicas, mas também pela exploração comercial de sua madeira, óleos essenciais, plantas ornamentais e, principalmente, por seus frutos comestíveis (Sardi *et al.*, 2017).

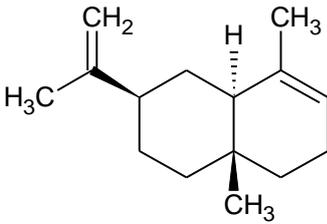
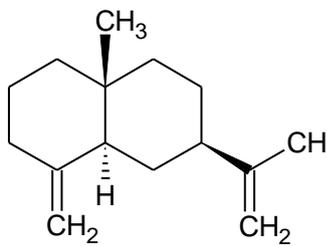
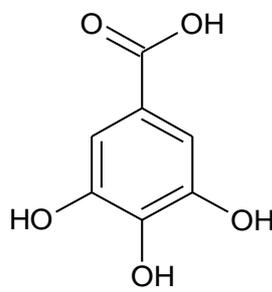
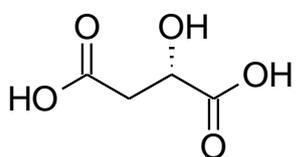
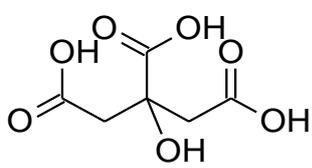
Os frutos de *Eugenia* spp. apresentam uma química variada de metabólitos secundários que exibem diferentes propriedades, tais como ação antioxidante, antidiarreica, antifebril, antirreumática e antiglicante, bem como uso como antibiótico no tratamento de doenças infecciosas, entre outras (Consolini *et al.*, 1999; Kanazawa *et al.*, 2000; Magina *et al.*, 2009, Ramos, 2019). O quadro 1

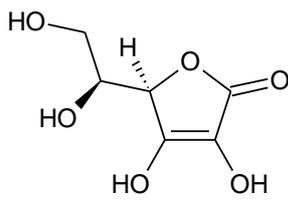
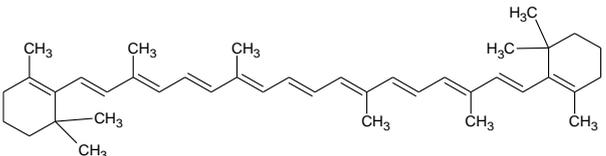
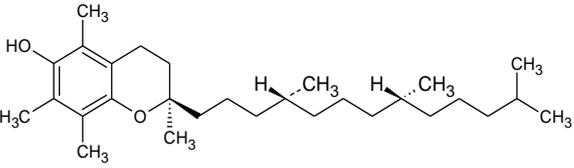
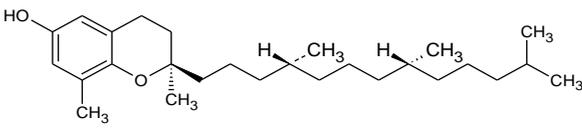
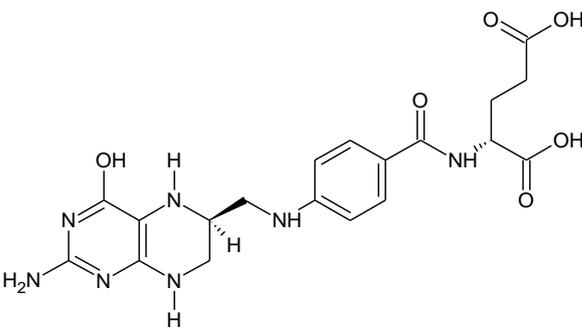
mostra algumas substâncias identificadas ou isoladas a partir dos frutos de *Eugenia* spp.

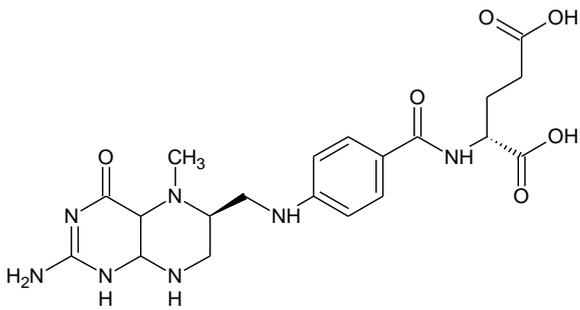
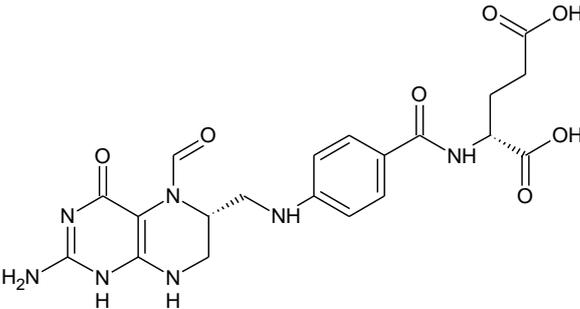
**Quadro 1.** Algumas substâncias identificadas ou isoladas a partir dos frutos de *Eugenia* spp.

Espécie	Nome	Estrutura	Referência
<i>E. uniflora</i> L.	Cianidina-3-glicosídeo	 <p>The structure shows a cyanidin cation (a flavylium ion) with a glucose molecule attached to the 3-position of the chromone ring. The glucose is in its cyclic form with hydroxyl groups at the 2, 3, 4, and 6 positions.</p>	(Ikuta <i>et al.</i> , 1985)
	Delfinidina-3-glicosídeo	 <p>The structure shows a delphinidin cation (a flavylium ion) with a glucose molecule attached to the 3-position of the chromone ring. The glucose is in its cyclic form with hydroxyl groups at the 2, 3, 4, and 6 positions.</p>	
<i>E. dysenterica</i> DC.	Rutina	 <p>The structure shows a rutin molecule, which consists of a quercetin aglycone linked to a glucose molecule at the 3-position and a rhamnose molecule at the 6-position of the glucose.</p>	(Guedes <i>et al.</i> , 2017a)

<p><i>E. stipitata</i> Mc Vaugh</p>	<p>Miricetina</p>		<p>(Correia et al., 2012)</p>
<p><i>E. dysenterica</i> DC.</p>	<p>Epicatequina</p>		<p>(Guedes et al., 2017b)</p>
<p><i>E. dysenterica</i> DC.</p>	<p>Quercetina</p>		<p>(Correia et al., 2012)</p>
<p><i>Eugenia uniflora</i> L.</p>	<p><math>\beta</math>-Ocimeno</p>		<p>(Marin et al., 2008)</p>

	<p><math>\alpha</math>-Selineno</p>		
	<p><math>\beta</math>-Selineno</p>		
<p><i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh</p>	<p>Ácido gálico</p>		<p>(Cuellar, 2013)</p>
	<p>Ácido málico</p>		<p>(Garzon <i>et al.</i>, 2012)</p>
	<p>Ácido cítrico</p>		<p>(Viana <i>et al.</i>, 2012)</p>

	Ácido ascórbico		(Gonçalves, 2008)
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	$\beta$ -caroteno		(Cardoso et al., 2011)
	$\alpha$ -Tocoferol		
	$\delta$ -Tocoferol		
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	Tetrahidrofolato		(Cardoso et al., 2011)

	5-Metil-Tetrahidrofolato		
	5-Formil-Tetrahidrofolato		

A *Eugenia uniflora* L., também conhecida popularmente como “pitanga” (figura 1), é uma fruta rica em substâncias que contribuem para atividades antioxidantes e antimicrobianas, indicando que sua ingestão regular poderia contribuir para a prevenção de doenças crônicas (Rodrigues *et al.*, 2016). Dentre as principais substâncias responsáveis pelas suas propriedades, estão os fenólicos, contendo ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinâmicos e flavonoides, tornando este fruto uma fonte de compostos antioxidantes (Lima, 2002; Bailao *et al.*, 2015). Além do seu importante papel na proteção contra raios UV-B, resistência a doenças, seja com agentes antifúngicos ou como fitoalexinas nas plantas, os flavonoides também contribuem para a saúde humana atuando como agentes antioxidantes (Harborne e Williams, 2000). Seu potencial antioxidante é atribuído principalmente a presença de uma fração de catecol no anel B, a presença de um grupo 3-hidroxil, um grupo carbonil em C-4 e uma ligação dupla entre C-2 e C-3 (Das e Pereira, 1990; Tournaire *et al.*, 1993). Segundo estudos de Vinholes e colaboradores (2017), o fruto dessa espécie também apresenta elevada atividade hipoglicemiante, sendo um forte inibidor da enzima  $\alpha$ -glicosidase.

As substâncias cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo foram isoladas e identificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrometro de Massas (CLAE-EM) e RMN nos frutos de *E. uniflora* L. (Ikuta *et al.*, 1985; Einbond *et al.*, 2004). Análises de CLAE-EM e RMN de frações e óleo essencial do fruto dessa espécie mostraram que o mesmo contém  $\beta$ -ocimeno (7,4 %),  $\alpha$ -selineno (7,2 %),  $\beta$ -selineno (5,2 %), germacrene B (7,2 %) e ácido hexadecanóico (11,7 %) (Einbond *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2008; Bagetti *et al.*, 2009). Outras substâncias, como a miricetina, a cianidina, a quercetina, o ácido elágico e as proantocianidinas foram identificadas nos resíduos secos de frutos de pitanga (Correia *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Frutos de *Eugenia uniflora* L. Fonte: Centro de Química da Madeira.

Estudos acerca do fruto de *Eugenia involucrata* DC., conhecida como cerejeira-do-mato ou cereja-do-rio-grande, mostraram que todas as partes dos frutos apresentam elevada atividade antioxidante, de modo que sua polpa contém o maior número de compostos fenólicos, seguido pela casca e sementes (Infante *et al.*, 2016; Lazarini *et al.*, 2016). No trabalho de Nicacio e colaboradores (2017), foi verificado que os compostos fenólicos que apresentaram maiores concentrações na casca, polpa e sementes foram a quercetina e os ácidos *p*-coumárico e gálico, respectivamente. Também apresenta atividade anti-inflamatória *in vivo*, o que parece estar relacionado à

ação antioxidante referente a presença dos compostos fenólicos quercetina e ácido gálico identificados no fruto (Infante *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Frutos de *Eugenia involucrata* DC. Fonte: Google Imagens.

A *Eugenia dysenterica* DC., também conhecida como “cagaita”, é uma importante espécie brasileira de frutos nativos com efeitos potenciais para a saúde associados à sua alta concentração de fenóis (Daza *et al.*, 2017). Os frutos da espécie, quando maduros, apresentam os seguintes compostos fenólicos: ácidos gálico, cafeico, vanílico, *p*-coumárico, siríngico, ferúlico e salicílico, epicatequina, quercetina e rutina (Guedes *et al.*, 2017a). Devido à alta concentração de compostos fenólicos, que são responsáveis pelas propriedades antioxidantes, o mesmo pode contribuir com efeitos benéficos para a saúde.

No trabalho de Bailão e colaboradores (2015), foi descrito que na polpa do fruto de *E. dysenterica* DC. ocorre a presença de outros ácidos orgânicos como o lático, málico, succínico, tartárico e cítrico, como também, carboidratos (principalmente glicose, sacarose e frutose). Outros trabalhos, no qual as análises dos carotenoides foram realizadas utilizando-se CLAE-DAD e os folatos por CLAE com detecção de fluorescência mostraram que os frutos de cagaita contêm elevado teor de carotenoides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e licopeno), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol e tocotrienol) e folatos (tetrahydrofolato, 5-metil-tetrahydrofolato, 5-formil-tetra-

hidrofolato), ácidos ascórbico, desidroascórbico e elágico (Gonçalves *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Frutos de *Eugenia dysenterica* DC. Fonte: Selos de Fruta.

### 3.2.1 O fruto de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh

O fruto da espécie *Eugenia stipitata* Mc Vaugh, também conhecido como “araçá-boi”, é nativo da floresta Amazônica. Tem o formato esférico, com 5-10 cm de diâmetro e pesa em torno de 150-200 g (Rogez *et al.*, 2004). Sua casca é fina, com uma espessura de 1 mm, de cor amarelada, muito aromática (Rogez *et al.*, 2004). Sua polpa é correspondente a 82 % da massa do fruto, com um aspecto cremoso e suculento, apresentando algumas fibras finas e um sabor fino, doce e ácido (pH = 2,5), com 6 a 15 sementes por fruta (Cavalcante, 1991; Rogez *et al.*, 2004). A polpa é também caracterizada por apresentar alto teor de carotenóides e alto teor de água [94,42 ± 0,10] % (Garzon *et al.*, 2012; Virgolin *et al.*, 2017). Suas sementes apresentam um teor de água de aproximadamente 60 % (Anjos, 1999). No quadro 2 está descrita a composição centesimal da polpa dos frutos de *E. stipitata*. A química do fruto é diversificada. O conteúdo de pectina da fruta a torna adequada para produzir sucos, néctares e geleias, o que lhe atribui um certo potencial econômico que precisa ser melhor explorado (Garzon *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2015). No trabalho de Garzon e colaboradores (2012) foram determinados os níveis de carotenoides no fruto, constatou-se que o seu conteúdo total é significativamente maior na casca [2484 ± 421 µg/100 g

de peso fresco (PF)] do que na polpa ( $806 \pm 348 \mu\text{g}/100 \text{ g PF}$ ), apresentando as substâncias luteína,  $\beta$ -criptoxantina e zaexantina como principais constituintes. Nas suas sementes foi identificado o ácido abscísico (Souza, 2009).

Os níveis dos flavonóides miricetina, quercetina e kaempferol nos frutos de *E. stipitata* foram determinados utilizando-se a técnica de CLAE, onde os valores constatados foram  $17,0 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ,  $5,1 \text{ mg}/100 \text{ g}$  e  $3,7 \text{ mg}/100 \text{ g}$ , respectivamente (Neri-Numa *et al.*, 2013).

A presença de compostos fenólicos é um indício dos potenciais antioxidante e nutracêutico no fruto. Contudo, outras substâncias também podem contribuir para estas propriedades, como os ácidos orgânicos. O ácido orgânico predominante no fruto de araçá-boi é o ácido málico, com o valor de  $2,83 \text{ g}$  de ácido málico/100 g de amostra (polpa e casca, base úmida) (Hernandez *et al.*, 2009; Garzon *et al.*, 2012). Outra substância com propriedades benéficas a saúde é o ácido cítrico, que também teve sua concentração determinada para a polpa do fruto de araçá boi, com o valor de  $2,38 \text{ g}$  de ácido cítrico/100 g (Viana *et al.*, 2012).

Segundo Gonçalves e colaboradores (2008), o fruto atrai bastante interesse para as áreas de estudo da saúde, pois é uma fonte expressiva de ácido ascórbico ( $78 \text{ mg}/100 \text{ g}$  de fruto seco), ainda que as quantidades encontradas desse ácido nos frutos possam sofrer variações devido a fatores, como a região, o clima e o solo. Essa concentração é bem próxima da encontrada por Ramos e colaboradores (2015) no fruto maduro da espécie de *Psidium acutangulum* (araçá pera), com concentração de  $74,32 \pm 1,23 \text{ mg}/100 \text{ g}$  de fruto, e bastante elevada em comparação com a espécie *Psidium friedrichsthalianum* (araçá-da-Costa-Rica), com concentração de  $4,68 \pm 1,62 \text{ mg}/100 \text{ g}$  de fruto.

Compostos voláteis foram isolados por extração líquido-líquido e analisados por CG-DIC e CG-EM a partir de frutos de *E. stipitata* ( $7,9 \text{ mg}/\text{kg}$  de fruta fresca), onde foram identificados ésteres, terpenos, alcoóis, ácidos orgânicos (dodecanóico, decanóico, hexanóico, octanóico e 2-metil-butanóico), hidrocarbonetos, lactonas e compostos de enxofre (Quijano, 2007). A composição centesimal é apresentada no Quadro 2.

**Quadro 2.** Composição centesimal da polpa dos frutos de *Eugenia stipitata*.

<b>Composição centesimal da polpa dos frutos de <i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh</b>		
pH		2,6 ± 0,2
Matéria seca MS (%)		4,0 ± 0,1
Proteínas (% MS)		11,9 ± 0,5
Cinzas (% MS)		4,0 ± 0,1
Açúcares (% MS)		49,2 ± 8,9
Glicose		3,1 ± 0,5
Frutose		33,9 ± 2,1
Sacarose		17,2 ± 0,8
		39 ± 4,3
Fibra dietética total (%MS)		
Teor de aminoácidos (g / 100 g de proteína) <sup>a</sup>		
Glicina		4,17 ± 0,1
Alanina		6,84 ± 0,1
Valina	6,3 <sup>b</sup>	4,77 ± 0,2
Leucina	8,8 <sup>b</sup>	6,05 ± 0,4
Isoleucina	5,6 <sup>b</sup>	3,79 ± 0,1
Prolina		3,46 ± 0,0
Fenilalanina		4,1 ± 0,2
Tirosina		2,94 ± 0,1
Serina		4,11 ± 0,2
Treonina	4,9 <sup>b</sup>	3,64 ± 0,1
Cisteína		1,78 ± 0,1
Metionina	3,2 <sup>b</sup>	1,84 ± 0,0
Asparagina + Ác. Aspártico		8,57 ± 0,0
Glutamina + Ác. Glutâmico		31,86 ± 2,1
Lisina	7,4 <sup>b</sup>	5,53 ± 0,2
Arginina	6,2 <sup>b</sup>	4,14 ± 0,0
Histidina	2,4 <sup>b</sup>	2,43 ± 0,1
Minerais e oligoelementos (mg/100g Peso Fresco)		
Na		1,64 ± 0,7
K		27,84 ± 4,0
Ca		5,72 ± 0,4
Mg		2,52 ± 0,2
P		7,4 ± 0,0
Fe		0,155 ± 0,0
Zn		0,18 ± 0,0

<sup>a</sup> O conteúdo de triptofano não foi determinado

<sup>b</sup> Proporção ideal para os seres humanos, com base nas necessidades essenciais de aminoácidos em valores diários, OMS/FAO (Fonte: Adaptado de Rogez, 2004).



**Figura 4.** Frutos de *Eugenia stipitata* (Fonte: Lira, A. C).

Assim como os frutos de outras espécies do gênero *Eugenia*, o araçá-boi também apresenta potencial antioxidante e nutracêutico (Contreras-Calderon *et al.*, 2011; Neri-Numa *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013). Essas propriedades podem ser verificadas no trabalho de Cuellar (2013), onde foi feito um estudo acerca da capacidade antioxidante (ensaios de ABTS, DPPH, FRAP e também por um método lipofílico de descoloração do  $\beta$ -caroteno) dos frutos de *E. stipitata* em diferentes estágios de maturação, constatando a partir da técnica de CLAE, a maior concentração de polifenóis estava presente no mesocarpo dos frutos no estágio verde (1200 mg/1000 g de fruto seco), seguido dos estados maduro (1100 mg/1000g de fruto seco). Os principais responsáveis por essa atividade antioxidante foram os ácidos clorogênico, gálico e cafeico (Cuellar, 2013).

Mesmo apresentando características, tais como, potenciais antioxidante e nutracêutico, os frutos de *E. stipitata* são altamente perecíveis, limitando o acesso a espécie (Neves *et al.*, 2015). Dessa forma é interessante submeter tais substratos a processos para obtenção de derivados alimentícios, como o exemplo de produção de bebidas, por meio da fermentação alcoólica.

### 3.3. Análise dos Potenciais Antioxidantes

A oxidação é um processo natural nos organismos vivos. O estresse oxidativo é um dos principais responsáveis pelo envelhecimento precoce e o surgimento de doenças crônicas (Goodwin e Brodwick, 1995; Denardin *et al.*, 2015). Portanto, pesquisas voltadas para a descoberta de substâncias antioxidantes, principalmente derivadas de produtos naturais, são crescentes. Essa sessão é uma breve revisão de alguns ensaios que podem ser realizados para avaliar os potenciais antioxidantes de matrizes.

#### 3.3.1. Ensaios para avaliação dos Potenciais Antioxidantes

Oxidantes e radicais livres são ditos como as principais espécies responsáveis pelo estresse oxidativo que acarreta o envelhecimento precoce e doenças crônicas como câncer, neurodegenerativas, diabetes e cardiovasculares (Goodwin e Brodwick, 1995; Floyd, 1999; Youdim e Joseph, 2001; Valko *et al.*, 2007; Denardin *et al.*, 2015). A geração de ROS (espécies reativas de oxigênio), dentro de certos limites, seja essencial para manter a homeostase (Finkel e Holbrook, 2000). Processos como a auto-oxidação (geração de radical que prossegue através de uma reação em cadeia, incluindo etapas de iniciação, propagação e finalização) tornam-se preocupantes quando envolvem o bem estar e a saúde de pessoas (Brandwilliams *et al.*, 1995).

Diante disso, fez-se necessária a criação de métodos para avaliar o potencial antioxidante das mais variadas matrizes, como produtos naturais ou bebidas fermentadas, com o intuito de saber quais seriam capazes de retardar ou anular os efeitos nocivos de espécies que propagam o estresse oxidativo.

Os principais ensaios analíticos para se medir as capacidades antioxidantes podem ser divididos em duas categorias, de acordo com os tipos de reações químicas: (1) ensaios baseados em reações de Transferência de Átomo de Hidrogênio (*Hydrogen Atom Transfer* - HAT) e (2) baseados em reações de Transferência de Elétron (*Electron Transfer* - ET), que consiste em determinar a capacidade de amostras provenientes de matrizes naturais em eliminar radicais

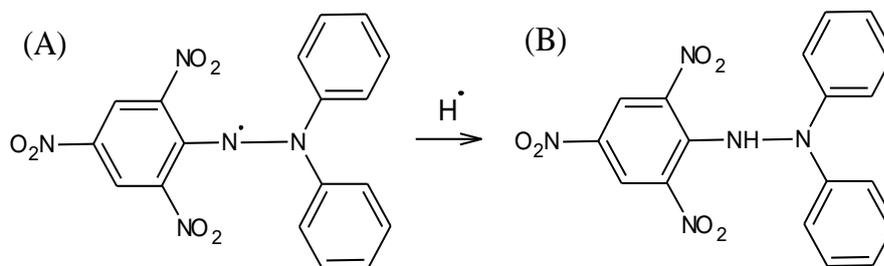
livres (ou oxidantes), diferenciando-se quanto ao radical iniciador, à cinética da reação e às reações secundárias (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005). No quadro 3 é possível observar alguns dos principais tipos de ensaios antioxidante, *in vitro*, baseados nos seus respectivos mecanismos químicos.

**Quadro 3.** Tipos de ensaios antioxidantes baseados em HAT e ET.  
(Fonte: Adaptado de Castelo-Branco, 2011).

Mecanismo da reação	Ensaio	Acompanhamento da reação
ET	DPPH	Espectrofotometria 515 nm
ET	ABTS	Espectrofotometria 750 nm
ET	FRAP	Espectrofotometria 595 nm
ET	CONTEÚDO DE FENOIS TOTAIS	Espectrofotometria 750 nm
HAT	ORAC	Fluorimetria excitação 485 nm emissão 525 nm
HAT	$\beta$ -CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO	470 nm

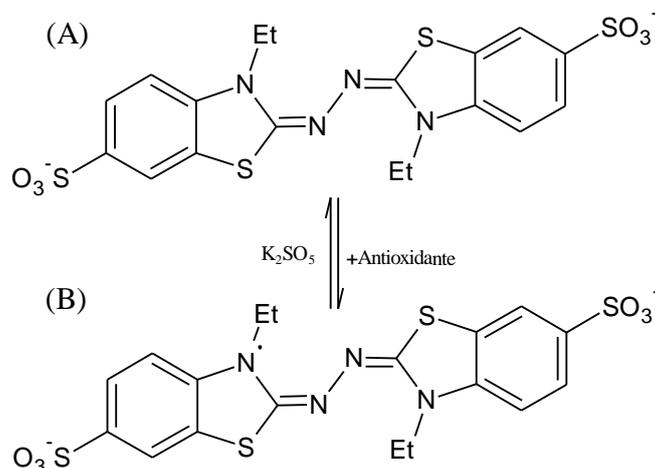
Dos ensaios apresentados (Quadro 3), destacam-se os de DPPH (radical 2,2-difenil-1picril-hidrazila) e o Conteúdo de Fenóis Totais (reagente de Folin–Ciocalteu) que são geralmente utilizados para medir a capacidade antioxidante em amostras de frutos (Ramos *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2018; Silva e Sirasa, 2018).

O ensaio antioxidante para medir a capacidade sequestrante do radical DPPH (figura 5 - A) é baseado na reação da solução deste radical com uma substância que pode doar um próton, de modo que essa solução radicalar passará para a forma reduzida (figura 5 - B) que pode ser observada com a mudança da cor violeta-escura para a amarelo devido ao decréscimo da absorbância em 515 nm (Molyneux, 2013; Schaich *et al.*, 2015).



**Figura 5.** (A) Radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila e (B) Não radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (Fonte: Adaptado de Molyneux, 2011).

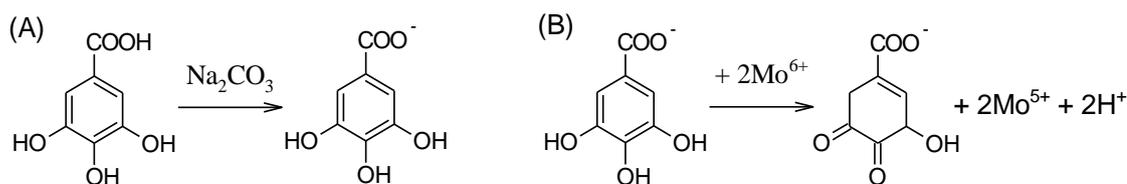
Outro ensaio colorimétrico envolve o cátion radical  $ABTS^{+\bullet}$ , esse se baseia na redução desse cátion radical, onde é possível verificar a mudança de coloração, devido a reação do radical durante a leitura a 750 nm (Schaich *et al.*, 2015). O ensaio de descoloração do cátion radical ABTS, baseia-se na redução do cátion radical ABTS por antioxidantes dos extratos de plantas testados (Magalhaes *et al.*, 2008).



**Figura 6.** (A) Não radical cátion radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico e (B) Cátion radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (Fonte: Adaptado de Schaich, 2015).

A determinação do Conteúdo de Fenóis Totais através (CFT) pelo método Folin-Ciocalteu é bem aceita por ser simples e reprodutiva. O reagente consiste em ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico que ao reagir com os compostos fenólicos (em condições alcalinas), ocorre a dissociação de um próton fenólico levando à formação do ânion fenolato, que por sua vez, é capaz de reduzir o

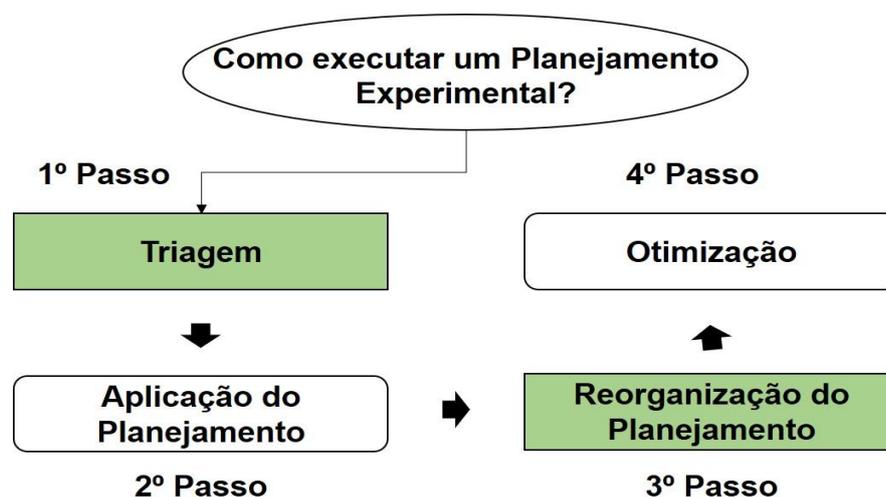
reagente, formando o complexo de molibdênio (Singleton *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005).



**Figura 7.** Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu. (A) formação do íon; (B) Reação com molibdênio (Fonte: Adaptado de Oliveira; Valentim; Goulart; Silva *et al.*, 2009).

### 3.4. Aplicação de Planejamento experimental na Otimização de Experimentos

Nesse contexto de determinar a melhor resposta antioxidante, destaca-se o Planejamento experimental (ou Design Of Experiments, DOE). Esse planejamento mostra-se interessante, pois possibilita, mas não se limita, a investigação de fenômenos críticos, criar um novo ou melhorar produtos já existentes, como também possibilita a otimização de respostas (Esbensen *et al.*, 2018). A otimização de experimentos ocorre por meio de uma investigação, no qual são avaliados quais fatores são considerados primordiais para o processo, além de reduzir o número de experimentos, reduzir os resíduos químicos (contemplando princípios da Química Verde) e, conseqüentemente, reduzindo os custos (Neto; Scarminio; Bruns, 2010; Filho, 2015). Sua primeira etapa consiste em uma triagem, onde são verificadas quais variáveis possuem maior influência nas respostas e uma segunda etapa que consiste na realização dos experimentos, seguido de um processo de reorganização do mesmo, onde serão analisados os resultados e verificado quais fatores podem ser cortados para a elaboração de um experimento completamente otimizado (Figura 12).



**Figura 8.** Esquema de Design Experimental (Fonte: Adaptado de Narenderan, et al. 2019).

O planejamento consiste na combinação aleatória de todos os níveis dos fatores simultaneamente, gerando um experimento  $\mathbf{b}^k$ , onde  $\mathbf{b}$  é o número de níveis e  $\mathbf{k}$  número de os fatores a serem investigados.

Os planejamentos considerados mais simples a serem realizados são os que possuem apenas dois níveis, superior e inferior, para os quais são atribuídos de forma arbitrária os valores +1 e -1, respectivamente. Desse modo é possível a construção de matrizes matemáticas para realizar os cálculos dos efeitos sem interferir nos experimentos ou resultados, fornecendo assim as informações necessárias para se obter um experimento na melhor condição, ou condição ótima (Filho, 2015; Narenderan *et al.*, 2019).

A aplicação do DOE vem se tornando cada vez mais aplicada nas pesquisas em diversas áreas e nesse contexto, destaca-se a Química devido às suas vantagens na otimização de variáveis individuais, gerando grande quantidade de informações a partir de um número reduzido de experimentos, como também pela possibilidade de avaliar o efeito de interação entre variáveis sobre a resposta (Narenderan *et al.*, 2019).

Portanto, a utilização de um planejamento experimental é primordial para o controle das atividades, de modo a saber os principais parâmetros e número de experimentos a serem realizados. Esse planejamento, além de diminuir o

número de procedimentos, possibilita a otimização dos resultados por fornecer as melhores condições experimentais.

Conduto, mesmo após a otimização de um experimento químico, ainda se faz necessário identificar os constituintes químicos presentes nessa determinada matriz química otimizada. Nesse contexto, análises por RMN e EM têm se mostrado as principais ferramentas disponíveis para a investigação de moléculas orgânicas presentes em matrizes complexas.

### **3.5. Análises de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas nos estudos de Metabolômica**

Uma das maiores dificuldades em se trabalhar com produtos naturais está relacionada ao fato de que a maioria das substâncias se apresentam em misturas complexas. Por muito tempo, abordagens de métodos clássicos, envolvendo o isolamento para a caracterização de constituintes químicos foram realizadas. No entanto, a necessidade de se reduzir o tempo das análises, como também adquirir informações de caráter qualitativo e quantitativo de um número significativo de amostras, impulsionaram o desenvolvimento dos estudos em metabolômica.

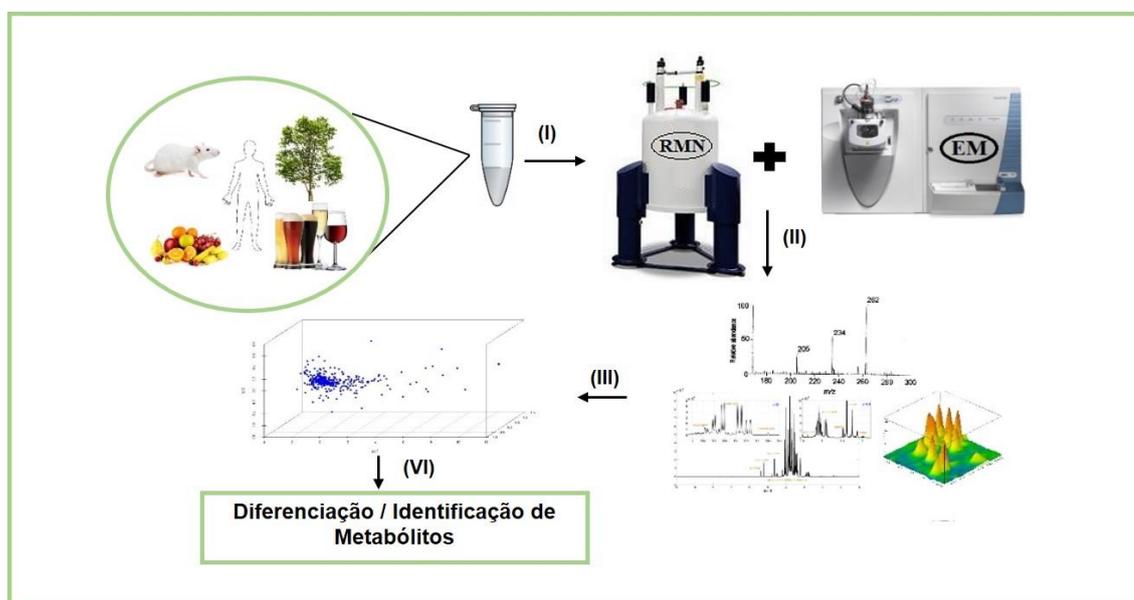
A metabolômica é uma das áreas da pesquisa que mais tem se desenvolvido nas últimas décadas. O estudo de metabólitos e suas alterações pode ser empregado as mais diversas matrizes, como as oriundas de sistemas biológicos, vegetais ou produtos alimentícios (Deborde *et al.*, 2017; Kikuchi e Yamada, 2017).

As principais técnicas analíticas utilizadas para realizar estudos em metabolômica são a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (EM) (Marshall e Powers, 2017). Com a utilização dessas duas técnicas é possível obter importantes informações estruturais, que podem ser de caráter qualitativo e quantitativo (Tangpaisarnkul *et al.*, 2018; Tomita *et al.*, 2018).

De modo simplificado, a análise por metabolômica pode ser descrita da seguinte forma: o metaboloma (amostra) é colhido ou extraído de dois ou mais grupos (por exemplo, região A *versus* região B) e uma técnica analítica (por exemplo, RMN ou EM) é usada para adquirir um perfil espectral (*fingerprint*) de cada uma amostra metabólica, de modo padronizado, podendo ser submetida posteriormente a análises por técnicas estatísticas multivariadas (por exemplo, análise de componentes principais [PCA] e análise hierárquica de *cluster* [HCA]), que são utilizadas para determinar padrões nesses grupos, mostrando se os metabolomas diferem ou não, identificando-se as características espectrais (como as dos metabolitos) que são as principais responsáveis pela distinção dos grupos formados (Marshall e Powers, 2017).

No trabalho de Mayengbam e colaboradores (2019), a abordagem metabolômica foi empregada utilizando-se a RMN de  $^1\text{H}$  para examinar os efeitos de uma bebida fortificada (contendo níveis excessivos de vitamina B) sobre a sensibilidade à insulina em adolescentes, onde foi aplicada a análise de componentes principais (PCA) para avaliar padrões mostrando que bebidas fortificadas com quantidades excessivas de vitaminas não são metabolicamente inertes.

Já no trabalho de Alves e colaboradores (2019), a abordagem metabolômica baseada em RMN de  $^1\text{H}$  e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência hifenada a Espectrometria de Massas (CLUE-EM) assistidas por quimiometria para avaliar a variabilidade nos vinhos Chenin Blanc e Syrah permitindo identificar características comuns e características diferentes, variando épocas de colheita, sistemas de treinamento e tipos de porta-enxertos. Ainda empregando RMN, mas correlacionando a técnica de Cromatografia Líquida a EM (CG-EM), Pinto e colaboradores (2019) realizaram um estudo metabolômico para caracterizar compostos susceptíveis de serem extraídos da cortiça pelo vinho na tentativa de encontrar uma relação entre o conteúdo destes compostos e a origem geográfica da cortiça. Portanto, o emprego da abordagem de metabolômica é essencial para a análise de matrizes, complexas, como os objetos de estudos deste trabalho (bebidas fermentadas de frutos). A figura 8 apresenta um esquema de análise por metabolômica.



**Figura 9.** Esquema de ilustração do fluxo de trabalho metabolômico que combina técnicas avançadas de espectroscopia de RMN e Espectrometria de Massas com estatísticas multivariadas. (I) Análise dos substratos por RMN e EM; (II) Obtenção dos espectros; (III) Análise multivariada dos dados; (IV) Diferenciação e identificação dos metabólitos.

### 3.5.1. Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq)

A RMN é uma técnica analítica capaz de fornecer dados qualitativos e quantitativos sobre a amostra. Esses dados quantitativos são obtidos seguindo a regra de que a intensidade  $I$  de um sinal é diretamente proporcional ao número de núcleos  $N$  da amostra, onde as intensidades dos sinais de RMN são equivalentes as áreas de sinais específicos, possibilitando a tomada desses dados para investigações quantitativas (Holzgrabe *et al.*, 2005). A relação entre a intensidade do sinal  $I$  e o número de núcleos observados é dada pela Equação I:

$$I = cS \times N \quad (I)$$

A constante de proporcionalidade  $cS$  resulta dos parâmetros do espectrômetro, conhecida como constante do espectrômetro (Holzgrabe *et al.*, 2005). Essa relação só considerada verdadeira nos aparelhos de RMN que funcionam por sequência de pulso, quando os *spins* dos hidrogênios estão na condição de equilíbrio térmico, o que equivale a um tempo de repetição da

sequência de pulsos com no mínimo cinco vezes maior que o tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ), certificando-se de que todos relaxem e, assim, apresentem sinais com intensidade de acordo com a equação (I) (Friebolin, 2010).

As medições de concentração com PULCON (Pulse Length-based Concentration determination) usam o princípio da reciprocidade que indica que os comprimentos dos pulsos de  $90^\circ$  e  $360^\circ$  são inversamente proporcionais à intensidade do sinal RMN (Hoult e Richards, 1976; Hoult, 2000; Wider; Dreier, 2006).

Após a aquisição do sinal de RMN no domínio do tempo, o espectro de RMN é obtido com a aplicação de um método matemático, chamado de Transformada de Fourier (TF). Neste caso, uma mesma molécula pode apresentar várias linhas espectrais, de acordo com as diferenças de deslocamento químico ( $\delta$ ) de seus núcleos de hidrogênio (Holzgrabe *et al.*, 2008). Dessa forma, para realizar as análises quantitativas deve-se escolher um dos sinais de maior intensidade e que não se sobreponha aos outros sinais espectrais (Santos, 2013).

A precisão das integrais determina a precisão da quantificação, dependendo também de outros parâmetros como: a relação Sinal/Ruído, a linha de base, a qualidade do *shimming*, a janela espectral e os ajustes de fase (Görög, 2000). Considerando esses parâmetros, os métodos de RMNq podem ser validados segundo as normas específicas.

Com as melhorias nas instrumentações e o avanço das pesquisas em RMN, tais como ímãs blindados de campo alto, criosondas, técnicas de supressão de solventes e sequências de pulso versáteis levaram muitos pesquisadores a explorar ainda mais a RMN como uma ferramenta quantitativa viável, apesar de sua menor sensibilidade (Limite de Detecção, LD, na faixa baixa de  $\text{mMol L}^{-1}$ ) quando comparada à espectrometria de massas (EM, LD na faixa baixa de  $\text{pmol L}^{-1}$ ) (Simmler *et al.*, 2014). Portanto, nos últimos anos muitos trabalhos, em diversas áreas do conhecimento têm explorado os métodos de RMNq.

No trabalho de Santos e colaboradores (2013), foi realizado um estudo para evidenciar a viabilidade da aplicação da técnica de RMN para análises quantitativas e qualitativas de formulações farmacêuticas por meio de

experimentos  $^1\text{H}$ , como também foi feita a validação desse método para se determinar o teor de paracetamol em 7 amostras comerciais.

Na linha de pesquisa de produtos naturais, Bonneau e colaboradores (2017), desenvolveram um método para quantificar de forma direta as Acetogeninas de Anonáceas (AAGs) em extratos brutos, utilizando a RMN. No entanto, existem diversos métodos de RMNq que podem ser selecionados, variando de acordo com a abordagem mais adequada para uma metodologia específica.

### 3.5.2. O método de quantificação ERETIC

A quantificação de constituintes individuais por meio de RMNq de  $^1\text{H}$  baseia-se na adição de um padrão interno que irá gerar um sinal de RMN para possibilitar a quantificação relativa ou a quantificação absoluta (Holzgrabe *et al.*, 2005). Portanto, é necessário escolher um padrão interno de elevada pureza, não necessariamente idêntico ao analito.

Como alternativa a quantificação realizada baseando-se diretamente no sinal de padrões internos adicionados, foram elaboradas propostas para se utilizar um sinal de referência produzido eletronicamente. Nesse contexto, surgiu o método ERETIC (do inglês, *Electronic REFerence To access In vivo Concentrations*), proposto inicialmente como uma maneira de evitar a adição de um composto de referência em análises de RMN *in vivo* (Referência Eletrônica para acesso a Concentrações *In vivo*) (Barantin *et al.*, 1997). Esse método baseava-se na produção de um sinal eletrônico gerado matematicamente por um hardware específico, localizado fora da gaiola de Faraday dos antigos espectrômetros, no qual o sinal era apresentado simultaneamente com o espectro da amostra (Barantin *et al.*, 1997).

Com o passar dos anos e os avanços nas pesquisas em Ressonância Magnética Nuclear, o método de ERETIC sofreu várias modificações para o aumento de sua precisão e acurácia, como também a substituição do hardware específico por um software capaz de adquirir e processar os dados para se determinar a concentração de um analito em diferentes tipos de matrizes, através

de experimentos unidimensionais e/ou bidimensionais (Akoka *et al.*, 1999; Akoka e Trierweiler, 2002; Michel e Akoka, 2004).

No presente trabalho está sendo utilizado um software mais aprimorado (versão mais atual), chamado de ERETIC2 (Tyburn e Coutant, 2016). Essa nova ferramenta é baseada no método de PULCON, no qual um padrão interno correlaciona às intensidades absolutas de dois espectros diferentes (Wider e Dreier, 2006).

Deste modo, contanto que a concentração de uma das amostras seja conhecida com precisão e que o pulso de 90° tenha sido previamente calibrado para as análises das amostras, as concentrações desconhecidas poderão ser calculadas a partir da Equação (II) (Tyburn e Coutant, 2016).

$$C_{desc} = k \times C_{ref} \frac{A_{desc} \times T_{desc} \times \theta_{desc} \times n_{ref}}{A_{ref} \times T_{ref} \times \theta_{ref} \times n_{desc}} \quad (II)$$

Os índices de **desc** e **ref** significam desconhecida e referência, respectivamente, **A** é o valor integral, **C** é a concentração, **T** é a temperatura, **θ** é a largura do pulso (geralmente utilizado para o pulso de 90° ou 30°, podendo ser aplicado para qualquer pulso calibrado), **n** é o número de transientes, e **k** é um fator de correção que leva em consideração o uso de diferentes valores de *rg* (*receiver gain*) para a medição da referência e das amostras desconhecidas.

O método de PULCON pode ser usado com padrões internos (adicionando-se a padrão dentro do tubo amostral) ou externos (sinal de referência eletrônica) e precisa que os espectros unidimensionais sejam adquiridos sob condições quantitativas, ou seja, um D1 (*Delay 1* ou tempo de repetição do pulso aplicado) igual a pelo menos  $5 \times T_1$  (para um pulso de 90°) ou  $3 \times T_1$  para um pulso de 30°, um tempo de aquisição maior que  $3 \times T_2$ , e uma relação de Sinal/Ruído de pelo menos 10 : 1) (Tyburn, 2016; Keeler, 2002). Essa ferramenta já foi aplicada e teve seu desempenho comparado com a quantificação através da adição de um padrão interno (ácido maleico, 10 mM), apontando uma performance similar (Walker *et al.*, 2011).

O uso do referenciamento eletrônico elimina erros nas análises como resultado da medida de padrões internos, bem como problemas indesejáveis como resultado da solubilidade dos padrões na solução de analito e interações químicas entre o analito e o padrão interno (Garrido e Carvalho, 2015).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Coleta dos frutos**

Os frutos maduros do araçá-boi (registro do SISGEN número AD5EEEC), foram coletados pelo Prof. Dr. Valdely Ferreira Kinupp, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Campus Manaus Zona Leste, localizado na região metropolitana da cidade de Manaus (3°04'46 "S 59°55'58" W), estado do Amazonas, Brasil. As coletas foram realizadas em três períodos diferentes. A coleta para a produção das bebidas do estágio I foi realizada em novembro de 2017, a segunda coleta foi feita em março de 2018 e a terceira coleta foi feita no período entre os meses de junho e outubro de 2018.

### **4.2. Produção das Bebidas Fermentadas da primeira etapa: Análise das variáveis**

A obtenção dos produtos fermentados foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia da Amazônia (IFAM), sob a supervisão da Profa. Dra. Lúcia Schuch Boeira.

A primeira produção de bebidas ocorreu em dois estágios (I e II), destinados à escolha das variáveis a serem utilizadas no planejamento fatorial. No estágio I, a produção foi realizada com o objetivo de selecionar uma levedura comercial para outra escala de produção. O araçá-boi (5,6 kg) foi higienizado com ácido peracético (0,5 g L<sup>-1</sup>), segundo as normas da Anvisa (2004) e centrifugado (Homestar™ HS-380) para obtenção do suco. Para o mosto, foram adicionados 2 L de água destilada e os Sólidos Solúveis Totais (SST) foram corrigidos para atingir 21° Brix. O pH foi corrigido até o valor de 2,8. Cinco cepas de leveduras comerciais (específicas para a produção de vinhos) de *Saccharomyces cerevisiae* foram empregadas como agentes de fermentação. As leveduras Biolievito Bianco, Biolievito Cerevisiae, Biolievito Rossofrutto, Arom Cuveé e Biolievito Bayanus foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante (Perdomini). As fermentações foram conduzidas em garrafas de vidro

âmbar equipadas com válvula tipo *airlock* e conduzidas a 18 °C em refrigerador D.B.O. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (Rizzon e Dall'agnol, 2009).

A evolução da fermentação foi acompanhada pela determinação do teor de SST (°Brix) a cada 24 h. Após a fermentação e a trasfega, as bebidas foram filtradas sob vácuo utilizando terra de filtração com um papel de filtro (diâmetro de 12,5 cm, 80 gm<sup>-2</sup>). Para esta filtração foi realizada numa pré-cobertura preparada usando 5% de prefibra (Biotec Sul) com a adição de 10% de biofiltro de terra 500 (BF500).

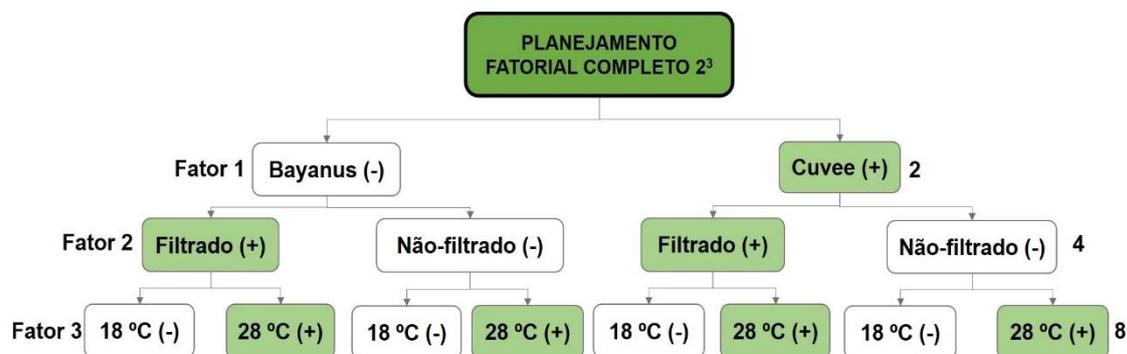
No estágio II, utilizou-se uma alíquota de 2,3 kg desse fruto. Os procedimentos do estágio I foram reproduzidos com alguma modificação [volume de água adicionada (500 mL), adição de sacarose (250 g) e alíquotas de levedura (170 mg)] nas quais foi utilizada a cepa *Biolievito Bayanus*. Metade da massa de fruto foi utilizada para uma produção sem a filtração com terra, sendo a outra metade preparada com a filtração. Alíquotas (1,0 mL) foram removidas durante o período de fermentação para determinar as concentrações de açúcares e teor alcoólico. Após o período de fermentação, todas as bebidas foram filtradas com terra, como foi descrito no estágio I. A tabela 1 mostra os códigos das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, como também as variáveis utilizadas nos processos produtivos empregados nos estágios I e II. As fermentações dos estágios I e II foram realizadas em duplicata.

**Tabela 1.** Códigos de leveduras comerciais e o processo avaliado nos estágios I e II.

Código	Nome	Etágio de uso	Parâmetro avaliado
BBI-I	Biolievito Bianco		
BCE-I	Biolievito Cerevisiae		
BRO-I	Biolievito Rossofrutto	I	Tipo de levedura
ACU-I	Arom Cuveé		
BBA-I	Biolievito Bayanus		
BBA-II-F			Filtração
BBA-II-NF	Biolievito Bayanus	II	Não-filtração

#### 4.2.1. Planejamento experimental fatorial

Foi elaborado um planejamento fatorial completo de  $2^3$  para a otimização do processo de produção dos fermentados (Filho, 2015). O software empregado para a construção da matriz foi o Minitab™ 18.1, com avaliação dos seguintes parâmetros experimentais: as duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas (Arom Cuvêe e Biolievito Bayanus), o processo filtração (com ou sem), e diferentes temperaturas no processo de fermentação (18 °C e 28 °C) (Figura 13).



**Figura 10.** Diagrama do planejamento fatorial completo adotado para a produção das bebidas fermentadas de araçá-boi.

Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata, fornecendo um total de 40 experimentos, realizados de acordo com a randomização do software Minitab™ 18.1. Na tabela 2 é demonstrada a sequência de aleatorização adotada para realização dos experimentos (análises de RMN, análises por Espectrometria de Massas e os ensaios antioxidantes) e a codificação das bebidas obtidas. Para os cálculos de efeitos: Fator 1 (Levedura); Fator 2 (Processo de filtração) e Fator 3 (Temperatura). Os cálculos de efeito para a obtenção das condições ótimas do experimento foram realizados no software Microsoft Excel 2016.

**Tabela 2.** Sistema de aleatorização adotado para realizar as análises, de acordo com o planejamento fatorial completo de 2<sup>3</sup>.

Ordem	Código	Temperatura (°C)	Processo	Ordem	Código	Temperatura (°C)	Processo
1	B18F 1	18	Filtrado	21	B18NF 3	18	Não-filtrado
2	C28NF 1	28	Não-filtrado	22	C28F 3	28	Filtrado
3	B28NF 1	28	Não-filtrado	23	B28F 3	28	Filtrado
4	C18F 1	18	Filtrado	24	B28NF 3	28	Não-filtrado
5	C18NF 1	18	Não-filtrado	25	C18NF 4	18	Não-filtrado
6	C28F 1	28	Filtrado	26	C18F 4	18	Filtrado
7	B18NF 1	18	Não-filtrado	27	C28F 4	28	Filtrado
8	B28F 1	28	Filtrado	28	C28NF 4	28	Não-filtrado
9	B18F 2	18	Filtrado	29	B18NF 4	18	Não-filtrado
10	B28F 2	28	Filtrado	30	B28F 4	28	Filtrado
11	B28NF 2	28	Não-filtrado	31	B18F 4	18	Filtrado
12	C18F 2	18	Filtrado	32	B28NF 4	28	Não-filtrado
13	C28F 2	28	Filtrado	33	C28F 5	28	Filtrado
14	B18NF 2	18	Não-filtrado	34	C18F 5	18	Filtrado
15	C28NF 2	28	Não-filtrado	35	C28NF 5	28	Não-filtrado
16	C18NF 2	18	Não-filtrado	36	B28F 5	28	Filtrado
17	C18F 3	18	Filtrado	37	B18F 5	18	Filtrado
18	C28NF 3	28	Não-filtrado	38	B28NF 5	28	Não-filtrado
19	C18NF 3	18	Não-filtrado	39	B18NF 5	18	Não-filtrado
20	B18F 3	18	Filtrado	40	C18NF 5	18	Não-filtrado

B = Bayanus; C = Cuvee; F = Filtrado; NF = Não-filtrado; 18 = 18 °C; 28 = 28 °C.

#### **4.2.2. Produção das Bebidas Fermentadas: Aplicação do planejamento fatorial completo para a segunda etapa de produção das bebidas**

A obtenção dos produtos fermentados foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia da Amazônia (IFAM), sob a supervisão da Profa. Dra. Lúcia Schuch Boeira.

Antes de iniciar a produção, os frutos coletados foram mantidos armazenados dentro de uma sacola plástica em um congelador a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Foram retirados os pedúnculos dos frutos e os mesmos foram sanitizados com solução de ácido peracético  $0,5\text{ g L}^{-1}$  (Anvisa, 2004). Os frutos foram pesados em uma balança digital (balmak<sup>®</sup>), no qual foi verificada uma massa de 22,1 kg de araçá-boi.

Posteriormente, os bagaços foram levados a duas centrífugas: Homestar<sup>™</sup> (HS-380) e Philips Walita (RI 1832) para obtenção do suco, armazenando-o em um fermentador inox de 30 L. Após a centrifugação foi obtida uma massa de suco equivalente à 1,972 kg. O volume final de suco obtido foi equivalente a 12 L. As avaliações de SST e do pH foram realizadas, sendo respectivamente 2 °Brix e 2,74.

A etapa seguinte consistiu na correção do pH, adicionando-se 16 g de um corretor de pH (Tetracomplex) para a correção do nível de açúcar foi utilizada a técnica de chaptalização. Foram adicionados 500 g de açúcar comum (sacarose) até o mosto atingir a marca de 21 °Brix (Dantas e Silva, 2017).

Realizadas as correções de SST e pH, o suco foi dividido, no qual, 6 L foram destinados a filtração e os outros 6 L litros não foram filtrados com terra antes de iniciar o período de fermentação.

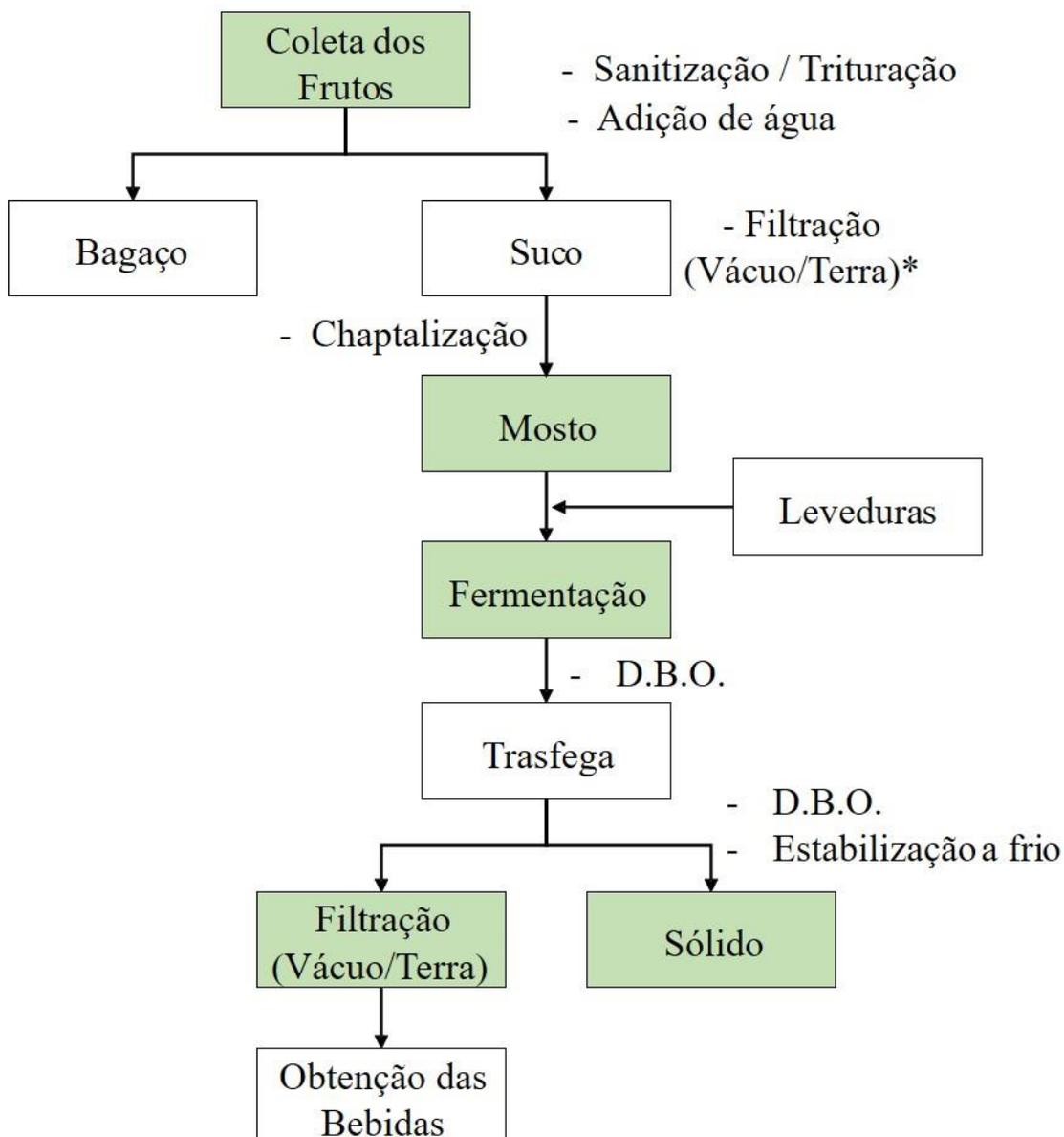
A levedura comercial utilizada como agente da fermentação foi a *Saccharomyces cerevisiae* (Perdomini), sendo metade das bebidas produzidas com a cepa de Arom Cuvêe, e a outra metade com Biolievito Bayanus. Estas foram pesadas em uma balança analítica (Master<sup>®</sup> AY220) e ativadas durante 20 minutos em água aquecida à  $38^{\circ}\text{C}$ . Após a ativação, as leveduras foram inoculadas aos mostos, onde foram agitadas até a homogeneização. Uma vez homogeneizadas, as soluções foram transferidas para garrafas de vidro âmbar

(500 mL), fechadas com válvulas *airlock* e então armazenadas em geladeira, onde metade das bebidas foi conservada a temperaturas de 18 °C e a outra metade a 28 °C até o fim do processo de fermentação. O acompanhamento do processo foi feito pela medição diária do nível de SST, até que as medidas se tornassem constantes.

Ao término do processo de fermentação, foi realizado o procedimento de trasfegas para outras garrafas de vidro, que foram devidamente sanitizadas. A transferência foi feita, com a simultânea filtração, utilizando-se funil e algodão. Concluída a trasfega, os fermentados foram conservados em um refrigerador do tipo D.B.O. sob as mesmas temperaturas no qual foram conservadas no período de fermentação (18 °C e 28 °C) em um período de 10 dias para sua maturação. O procedimento geral do processo de produção dos fermentados está representado na figura 11.

Após a etapa de maturação as bebidas foram filtradas, utilizando-se a terra de Diatomita para o preparo da pré-cama (lavagem e fixação do filtro no funil), e terra do tipo Biofilter para a filtração do fermentado. A filtração foi realizada com o auxílio de uma bomba de vácuo.

Depois de filtrados, os fermentados foram transferidos para garrafas (envasamento), previamente sanitizadas, sendo armazenados novamente à D.B.O. para amadurecerem antes do consumo.



**Figura 11.** Processo de produção dos fermentados alcoólicos de arachá-boi. \* = Filtração com Terra, realizada apenas em metade das amostras no estágio II e para a metade das amostras produzidas pelo planejamento fatorial completo.

Para analisar as características sensoriais das amostras dos oito tipos de bebidas fermentadas produzidas, os testes de análise preferencial foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do IFAM, Campus Manaus Centro.

As análises preferenciais foram realizadas com 10 provadores não treinados, de ambos os sexos, todos com idade superior a 18 anos, sendo eles

membros, ou não do instituto, relatando suas preferências com relação às bebidas fermentadas. Para tanto, as bebidas foram dispostas em taças de vidro de 50 mL, codificados com números disposto de forma aleatória de 1 a 8, servidos uma por vez para cada um dos degustadores, intercalados por água mineral.

A aceitabilidade dos fermentados foi mensurada por meio da aplicação de um Teste de Aceitação (Stone e Sidel, 2004; Minim, 2018), no qual as amostras foram avaliadas com o auxílio de uma escala hedônica estruturada em 9 pontos, na qual foi atribuída nota 1 para “desgostei extremamente” e nota 9 para “gostei extremamente”. Nesse teste foram avaliados os seguintes atributos do vinho: aroma, sabor e intenção de compra para conhecer a atitude dos consumidores em relação ao produto avaliado. Para isso, foi empregada uma escala estruturada em 5 pontos, em que o valor 1 corresponde a “certamente não compraria” e o valor 5 a “certamente compraria”. A tabela 3 contendo a pontuação e as classificações da análise preferencial. As fichas utilizadas para a realização das análises preferenciais podem ser encontradas no apêndice I deste trabalho (páginas 104 a 105).

**Tabela 3.** Tabela de avaliação da análise preferencial.

<b>Pontos</b>	<b>Classificação para Aroma e Sabor</b>	<b>Classificação para Intenção de Compra</b>
1	Desgostei extremamente	Certamente não compraria
2	Desgostei muito	Provavelmente não compraria
3	Desgostei	Talvez sim, talvez não compraria
4	Desgostei pouco	Provavelmente compraria
5	Não gostei nem degostei	Certamente compraria
6	Gostei pouco	---
7	Gostei	---
8	Gostei muito	---
9	Gostei extremamente	---

### 4.3. Ensaios para a avaliação dos Potenciais Antioxidantes

Os ensaios para a avaliação dos potenciais antioxidantes das amostras foram realizados no Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaios Químicos (LAEQ) da Central Analítica da UFAM sob a supervisão e co-orientação da Prof. Dra. Jaqueline de Araújo Bezerra.

#### 4.3.1. Ensaio de capacidade sequestrante do radical DPPH

O ensaio do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi realizado conforme (Molyneux, 2004) com modificações. Este ensaio foi realizado duas vezes. No primeiro foram analisadas as amostras dos estágios I e II e as respostas foram apresentadas por equivalência de Trolox. No segundo ensaio foram analisadas as amostras do planejamento fatorial e as respostas foram dadas em CI50.

No ensaio de DPPH, foram adicionados na microplaca de 96 poços, 10 µL dos fermentados (1:10) e 190 µL de solução metanólica de DPPH (60 µM). Após 30 minutos, na ausência de luz, foi medida a absorbância em Leitora de Microplaca (Elx800, Biotek) a 515 nm. Os resultados foram expressos em µM de Equivalentes de Trolox. Os valores de atividade antioxidante (AA) foram calculados conforme a Equação III:

$$AA(\%) = \left[ \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right] \times 100 \quad (III)$$

Onde  $A_{controle}$  é a absorbância do controle e  $A_{amostra}$  é a absorbância da amostra. Os valores da Concentração Inibitória a 50% - CI<sub>50</sub> das amostras e do padrão foram calculados com base na interpolação da curva de calibração a 50% de inibição do radical DPPH. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.3.2. Ensaio de capacidade sequestrante do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>

O ensaio contra o radical livre ABTS foi baseado no método desenvolvido por Re e colaboradores (2010), com modificações. O radical ABTS<sup>•+</sup> foi preparado pela reação entre a solução de ABTS (0,6 mol L<sup>-1</sup>) com persulfato de sódio (140,0 mmol L<sup>-1</sup>) e diluído para absorvância de 0,700 a 750 nm. A reação entre a amostra e o radical a 1:100 por 6 min e as leituras foram realizadas em uma leitora de Microplaca (Elx800, Biotek) a 750 nm. O resultado foi expresso em  $\mu\text{M}$  de Equivalentes de Trolox. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.3.3. Ensaio para Determinação de Fenóis Totais**

O ensaio de determinação de fenóis totais também foi realizado duas vezes. No primeiro experimento foram analisadas as amostras dos estágios I e II. No segundo experimento foram analisadas as amostras do planejamento fatorial.

A determinação de FT foi realizada pelo utilizando reagente de Folin Ciocalteu (Velioglu et al., 1998). Em microplaca de 96 poços, 20  $\mu\text{L}$  de amostra com 150  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin Ciocalteu (1:10 no primeiro ensaio e 1:1 no segundo ensaio) por 5 minutos e após esse período adicionado 150  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de sódio. As leituras foram realizadas após 90 minutos, na ausência de luz, em um comprimento de onda de 750 nm em um leitor de Microplaca (Elx800, Biotek). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em Equivalentes de ácido gálico por litro de fermentado.

#### **4.4. Identificação estrutural dos constituintes químicos das Bebidas Fermentadas**

Para realizar a identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos presentes nas bebidas fermentadas, foram utilizadas as técnicas de Espectrometria de Massas (EM) de baixa resolução e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de alta resolução, com experimentos unidimensionais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135) e bidimensionais (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  - Correlation Spectroscopy, HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence e HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Os experimentos foram realizados com sequências de pulsos padrão da Bruker.

Para a determinação estrutural dos compostos orgânicos presentes nas bebidas fermentadas, foi utilizada a sequência de pulsos LC1PNGPPS, juntamente com os experimentos 2D. O software Chenomx NMR (versão 8.43) foi empregado para auxiliar na identificação dos compostos nas bebidas fermentadas, bem como o banco de dados da biblioteca HMDB (*The Human Metabolome Database*) (2018).

As análises por Espectrometria de Massas (EM) de baixa resolução foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LabCEM) localizado na Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM.

Os Espectros de Massas de baixa resolução foram obtidos através de um Espectrômetro de Massas, Thermo Scientific, modelo LCQ Fleet, com fonte de Eletrospray (ESI) e um analisador *Ion-Trap* (IT), onde as amostras foram obtidas por inserção direta (solvente metanol), com fluxo contínuo.

##### **4.4.1. Análises qualitativas e quantitativas por RMN**

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLab), localizado na Central

Análítica do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Todas as amostras destinadas as análises por RMN foram preparadas com 550  $\mu\text{L}$  de amostra e 60  $\mu\text{L}$  de solvente  $\text{D}_2\text{O}$  contendo  $\text{TMSP-}d_4$  (0,5  $\mu\text{M}$ ), em espectrômetro de RMN (Bruker Avance IIIHD, 11,74 T, sonda BBFO Plus SmartProbe™). Todos os experimentos de RMN foram adquiridos e processados no software TopSpin 4.0.6 da Bruker. Nesse software os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) estão expressas em Hertz (Hz).

As sequências de pulsos NOESYGPPR1D (região de supressão 4,8 ppm) e LC1PNGPPS (regiões de integração: 4,6 ppm, 3,5 ppm e 1,0 ppm) foram utilizadas para as supressões dos sinais do solvente ( $\text{H}_2\text{O}$  90 % /  $\text{D}_2\text{O}$  10 %) e do etanol, respectivamente. Para a realização destas análises, foram padronizados os seguintes parâmetros: (AQ\_MOD – Modo de aquisição: DQD, TD – Tamanho do Fid: 64k , DS - Número de transientes fictícias: 04, NS – Número de varreduras: 10, SW – Janela espectral: 19,99 ppm, AQ – Tempo de aquisição: 3,27 s and PLW1 – Potência do pulso: 20,32 W), realizados à temperatura de 298 K. O pulso de  $90^\circ$  foi calibrado para cada um dos compostos identificados e o  $D_1$  foi devidamente calculado ( $D_1 = 19,1$  s), respeitando-se o tempo necessário para garantir a validade do método, sendo 7 vezes o valor de  $T_1$ . O valor de  $T_1$  foi calculado baseando-se no dubleto em 8,62 ppm, referente ao padrão quinina (10,0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Para a realização das análises quantitativas utilizou-se o método de PULCON (Tyburn e Coutant, 2016). O protocolo abordado para as análises de RMNq pode ser encontrado no apêndice II deste trabalho (páginas 106 a 111).

A determinação das concentrações foi feita a partir da integração dos sinais dos hidrogênios anoméricos dos açúcares  $\alpha$ -glicose e  $\beta$ -glicose, dupletos em  $\delta$  5,2 ppm e  $\delta$  4,6 ppm, respectivamente. Foram também integrado o tripleto em  $\delta$  1,16 ppm, referente ao etanol e os simpletos nas regiões de  $\delta$  7,23 ppm e  $\delta$  6,83 ppm para ácido gálico e o tirosol, respectivamente. As quantificações referentes ao ácido gálico e ao tirosol foram realizadas em quintuplicata e expressas em média e desvio padrão.

Para as análises quimiométricas foi utilizada a sequência de pulsos LC1PNGPPS com o valor do  $rg$  fixado em 114 e as aquisições procederam-se por meio de comandos automáticos [Tuning, Matching, Shimming, NS, DS, O1 (Transmitter Frequency Offset for Channel F1 em Hz) e TD] de modo a padronizar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos.

#### 4.4.2. Análise por Espectrometria de Massas

Para a geração e a análise dos Espectros de Massas de varredura total foram realizados nos modos positivo e negativo, bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios ( $\text{MS}^n$ , onde  $n$  é número de espectros de massas gerados pelas fragmentações), sob as seguintes condições: tensão de pulverização de 5,0 kV, pressão da bainha e gás auxiliar de 35 e 5 psi ( $\text{N}_2$ ), respectivamente; temperatura capilar 220 °C no modo positivo e 200 °C negativo, lente do tubo Compensação de  $\pm 109$  V. O intervalo de aquisição foi de  $m/z$  50-1000.

As fragmentações foram realizadas utilizando energia de colisão entre 1 a 30 eV. O gás para auxílio na fragmentação será o Hélio. O software Xcalibur® versão 2.1 (Thermo scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrais.

#### 4.5. Análises Univariadas e Multivariadas

Foi utilizado o método de Modelo Linear Generalizado (MLG) para analisar os dados obtidos pela análise preferencial. Codificação de fator: -1; 0; +1; Interações de ordem: 2; Confiança; 90% (bilateral) (WU et.al., 2019).

O teste Ryan-Joiner (semelhante ao teste Shapiro-Wilk) foi empregado para avaliar o padrão de distribuição normal. A ANOVA, com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), foi realizada para investigar o efeito das variáveis utilizadas no estágio I na capacidade antioxidante das bebidas. Os testes foram realizados no software Minitab™ 18.1.

Os dados espectrais de  $^1\text{H}$  RMN foram adquiridos de forma padronizada para então serem importados para o software RStudio™ 1.0.44, onde foram geradas duas matrizes de dados. Os dados foram tabelados utilizando-se o algoritmo OBA (*Optimized Bucketing Algorithm*), após serem alinhados, seguido da exclusão das regiões onde foram realizadas as supressões dos sinais do solvente e do etanol. O algoritmo OBA foi usado com um tamanho de *bucket* de 0,04, com grau de liberdade de 50% (Sousa *et al.*, 2013). A matriz I contemplou a região de 0,5 - 11 ppm (regiões de exclusão: 11,0 - 12,0 ppm). A matriz II e a matriz III foram geradas a partir da matriz I, no qual na II foram utilizados apenas os dados referentes às bebidas produzidas na temperatura de 18 °C. Para a matriz III, foram utilizados apenas os dados das bebidas obtidas do processo em que se fixou a temperatura em 28 °C.

A análise multivariada dos dados de RMN foi realizada empregando-se os métodos de Análise dos Componentes Principais (PCA) e análise por Agrupamento Hierárquico de *Cluster* (HCA) (Esbensen *et al.*, 2018). Após o pré-tratamento, os dados foram importados para o software The Unscrambler™ 10.3, onde foram analisados por dois métodos multivariados, não-supervisionados (PCA e HCA). Os dados espectrais foram processados com derivação Savitsky-Golay (SG), seguido de uma normalização por alcance (Range normalization).

A PCA foi realizada empregando-se o algoritmo de Decomposição do valor Singular (SDV) devido aos pequenos fatores de dados, conjuntamente com validação cruzada e peso 1,00 para todos os pontos, os quais foram centrados na média. A HCA foi empregada utilizando-se o método de Ward's, com Distância Euclidiana Quadrada (*Squared Euclidean distance*).

## 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 5.1. Seleção das bebidas e análise do processo de fermentação

O acompanhamento do período de fermentação foi feito a partir da leitura diária dos valores de SST, partindo de 21 °Brix, até esses valores serem reduzido para 5 °Brix, permanecendo constantes. Esse fato foi observado no 15º dia de fermentação, demonstrando que o processo de fermentação foi encerrado devido às baixas concentrações de açúcares presentes no meio, impossibilitando que a continuação do processo fermentativo (Pereira *et al.* 2019).

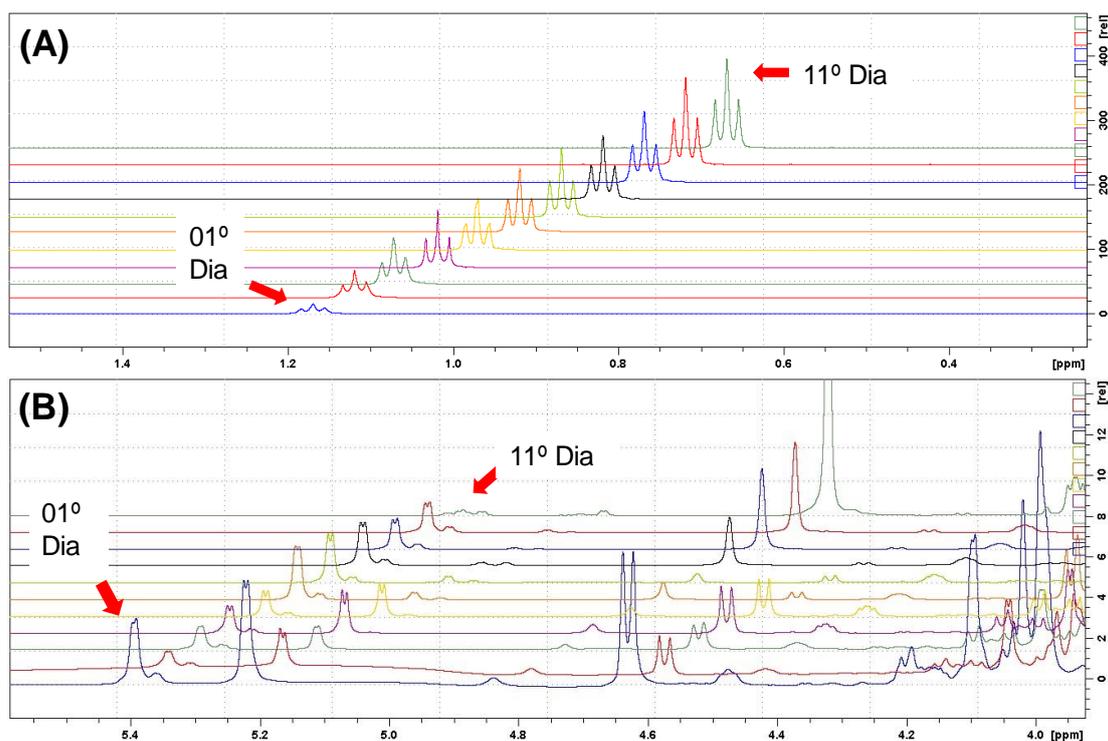
Das cinco bebidas produzidas inicialmente no estágio I, foram selecionadas apenas as bebidas fermentadas obtidas com as cepas de Biolievito Bayanus e Arom Cuvee por meio de uma análise preferencial, na qual foram avaliados aroma e sabor das bebidas. O critério de escolha das bebidas foi posteriormente validado com os resultados das atividades antioxidante dessas bebidas, em que as mesmas se destacaram com boas respostas, como será apresentado na sessão dos resultados das atividades antioxidantes.

No estágio II, foi realizada avaliação do efeito do processo de filtração sobre as bebidas, no qual foram utilizadas as cepas da levedura Biolievito Bayanus. Este processo fermentativo perdurou por onze (11) dias, até que os valores de SST alcançassem o valor de 5 °Brix, conforme observação anterior.

Outra metodologia acompanhamento do processo fermentativo ocorreu pelo monitoramento dos níveis de etanol e açúcares livres por RMN <sup>1</sup>H. Os espectros de RMN <sup>1</sup>H referentes tais amostras do estágio II foram obtidos por meio de alíquotas retiradas diariamente durante todo o processo fermentativo.

Na figura 12 (A), onde foi utilizada a sequência de pulsos NOESYGPPR1D para monitorar o tripleto em  $\delta$  1,16, referente ao etanol presente na amostra, observou-se que do primeiro ao décimo primeiro dia de fermentação houve um aumento gradativo da quantidade de etanol. Já na figura 12 (B), onde foi utilizada a sequência de pulsos LC1PNGPPS para realizar o monitoramento do dubleto referente ao hidrogênio anomérico da sacarose em  $\delta$  5,40 (*d*, *J* = 3,5 Hz) foi observado que do primeiro ao décimo primeiro dia de fermentação houve a

diminuição da quantidade de sacarose presente na amostra, como se é esperado para um processo de fermentação acoólica (Bisson, 2004; Chidi *et al.*, 2018).



**Figura 12.** Sobreposição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  referentes as alíquotas dos fermentados de araçá-boi coletadas coletado das bebidas produzidas no estágio II, no período entre o dia 01 e o dia 11 (11,7 T,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ ). (A) Tripleto do etanol; (B) Dupleto da sacarose. \*Informações complementadas pelos dados quantitativos da tabela 7.

Ao término do processo fermentativo, os oito tipos de bebidas fermentadas de araçá-boi foram submetidas aos testes de análises preferenciais. Dentre os testes sensoriais disponíveis para medir a aceitação, preferência e intensão de compra dos consumidores com relação a um ou mais produtos, a escala hedônica, estruturada é uma das mais utilizadas devido à confiabilidade e a validade de seus resultados, bem como por sua simplicidade de aplicação (Stone e Sidel, 2004; Minim, 2018). A tabela 4 apresenta os resultados da análise preferencial das bebidas fermentadas.

**Tabela 4.** Valores médios da análise preferencial das bebidas fermentadas de araçá-boi.

<b>Código: Análise Preferencial</b>	<b>Bebida</b>	<b>Aroma</b>	<b>Sabor</b>	<b>Intenção de Compra</b>
1	B18F	7,2 ± 2,4	6,8 ± 2,5	3,6 ± 1,9
2	C18F	6,3 ± 0,8	6,1 ± 1,4	3,5 ± 1,9
3	B28F	6,1 ± 2,5	5,3 ± 2,9	3,1 ± 1,8
4	C28F	7,2 ± 1,0	6,2 ± 2,4	3,5 ± 2,1
5	B18NF	5,4 ± 2,2	4,8 ± 2,5	3,1 ± 0,7
6	C18NF	6,6 ± 1,4	6,4 ± 0,9	3,2 ± 1,7
7	B28NF	6,1 ± 1,9	6,0 ± 1,5	3,1 ± 1,5
8	C28NF	5,2 ± 2,6	4,7 ± 2,7	3,0 ± 1,5

Em relação ao aroma das bebidas, tanto as elaboradas com as cepas de Arom Cuvee, quanto às de Biolievito Bayanus obtiveram bons resultados (C28F: 7,2 e B18F: 7,2), apresentando os mesmos valores, o que indica que os provadores classificaram as bebidas entre, “gostei pouco” (6 pontos) e “gostei muito” (8 pontos). O modelo linear generalizado mostrou que para a característica de aroma, os fatores, bebida ( $p = 0,026$ ) e avaliador ( $p = 0,000$ ) foram estatisticamente significativos. Com relação aos coeficientes, destacaram-se as bebidas B18F ( $p = 0,046$ ), B18NF ( $p = 0,018$ ) e C28F ( $p = 0,019$ ). Já, dentre os avaliadores destacaram-se o 2 ( $p = 0,061$ ), 5 ( $p = 0,007$ ), 6 ( $p = 0,028$ ), 7, ( $p = 0,015$ ), 8 ( $p = 0,006$ ) e 9 ( $p = 0,014$ ).

Para a característica sabor, as bebidas fermentadas que se destacaram entre os provadores foram a B18F (com média de 6,8) e a C18NF (média de 6,4 pontos), apresentando a classificação intermediária de “não gostei, nem desgostei” (média de 5 pontos) e “gostei” (média de 7 pontos). O modelo mostrou que para a característica de sabor, os fatores, bebida ( $p = 0,051$ ) e avaliador ( $p = 0,000$ ) foram estatisticamente significativos. Com relação aos coeficientes, destacaram-se as bebidas B18F ( $p = 0,020$ ) e B18NF ( $p = 0,025$ ). Enquanto, dentre os avaliadores, destacaram-se o 5 ( $p = 0,008$ ), 6 ( $p = 0,001$ ), 7 ( $p = 0,001$ ) e 9 ( $p = 0,030$ ).

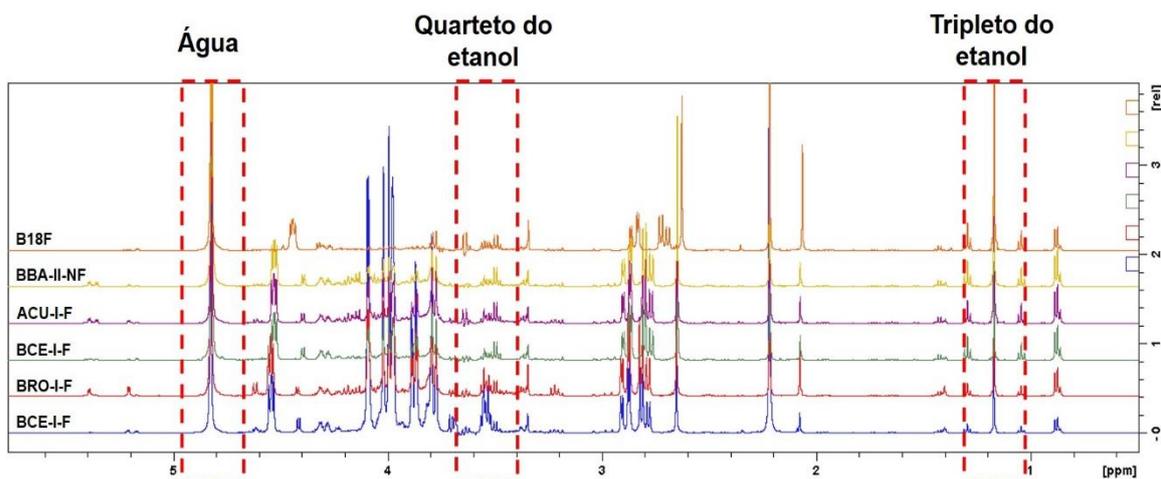
Quando questionados em relação à intenção de compra das diferentes bebidas fermentadas, os provadores classificaram a bebida B18F como “talvez compraria” (com média de 3,6 pontos), seguida pelas bebidas fermentadas C18F e C28F (ambas com a mesma média de pontos: 3,5). O modelo mostrou que para a característica de intensão de compra, apenas o fator avaliador ( $p = 0,000$ )

foi estatisticamente significativo. Com relação aos coeficientes, não houve destaque de nenhuma das bebidas, destacando-se os avaliadores 6 ( $p = 0,0018$ ), 7 ( $p = 0,024$ ) e 8 ( $p = 0,000$ ).

Diante dessa avaliação, o destaque das análises preferenciais foi a bebida fermentada B18F, a qual apresentou as maiores pontuações para as características aroma, sabor e intenção de compra.

## 5.2. Identificação dos constituintes por RMN

Para realizar a identificação das substâncias, foi utilizada a sequência de pulsos LC1PNGPPS, que proporciona a supressão múltipla de sinais, possibilitando então a supressão dos sinais do solvente (água) e do etanol. A figura 13 mostra a sobreposição dos espectros das bebidas de araçá-boi e as respectivas regiões onde foram feitas as integrais para a supressão dos sinais.



**Figura 13.** Sobreposição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  0,00-5,799 ppm) das bebidas fermentadas de araçá-boi, com a sequência de pulsos LC1PNGPPS (11,7 T,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ ). Sinais suprimidos:  $\delta$  4,699 ppm (água),  $\delta$  3,566 ppm (quarteto do etanol) e  $\delta$  1,097 ppm (triplete do etanol).

A partir das análises dos espectros de RMN 1D e 2D foi possível identificar 10 substâncias, confirmadas pelo deslocamento químico ( $\delta$ ), valores de constante de acoplamento ( $J$ ), confirmados pelas correlações nos experimentos

de COSY, HSQC e HMBC, como também por meio de comparação com os dados de espectrometria de massas, dados da literatura e software Chenomx NMR (versão 8.43) (Alves, 2007; Oliveira, 2012; Santana, 2017). A tabela 5 apresenta os compostos identificados nas bebidas fermentadas. Nos espectros de  $^1\text{H}$  das bebidas fermentadas foi possível identificar os sinais característicos dos ácidos málico, cítrico, gálico e succínico. Para o ácido málico foram identificados dois dupletos em  $\delta$  2,72 ( $J=7,2$  Hz) e  $\delta$  2,83 ( $d$ ,  $J=4,5$  Hz) e um duplo dubleto em  $\delta$  4,44 ( $dd$ ,  $J=4,5$ ;  $J=7,2$  Hz).

**Tabela 5.** Dados espectrométricos das bebidas fermentadas de araçá-boi (11,7 T, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O).

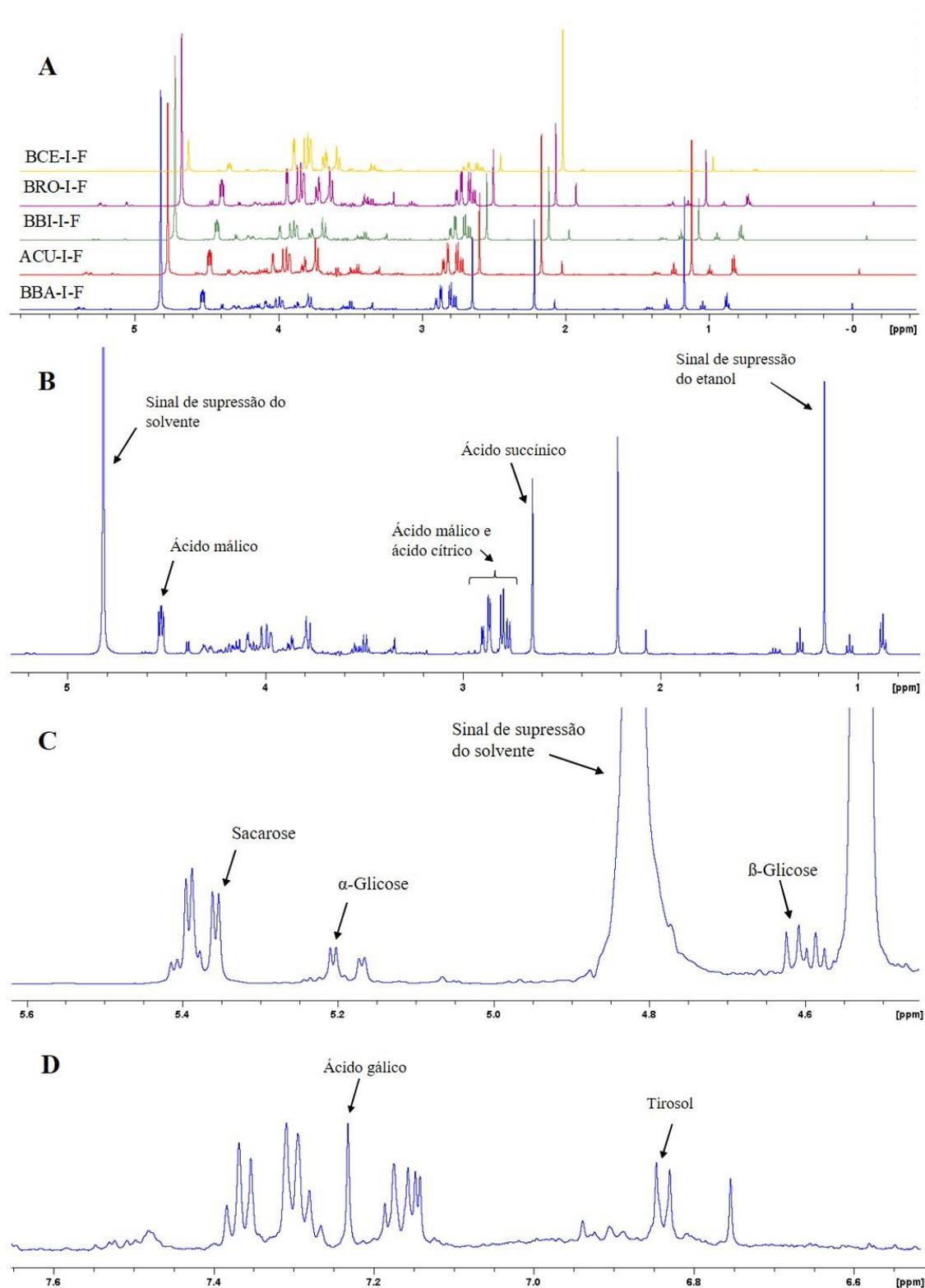
Grupos	Compostos	<sup>1</sup> H δ (ppm)	<sup>13</sup> C δ (ppm)	EM (m/z)	Literatura
Ácidos orgânicos e derivado substituído do benzeno	Ácido málico	2,72 (H-3a, <i>d</i> , <i>J</i> =7,2 Hz) 2,83 (H-3b, <i>d</i> , <i>J</i> =4,5 Hz) 4,44 (H-2, <i>dd</i> , <i>J</i> =7,2:4,5 Hz)	42,4 (C-3); 70,0 (C-2); 177,6 (C-4); 180,0 (C-1)	133	(Santana, 2017)
	Ácido cítrico	2,68 (H-2a, <i>d</i> , <i>J</i> =15,6 Hz) 2,86 (H-2b, <i>d</i> , <i>J</i> =15,6 Hz)	41,8 (C-2); 70,3 (C-3); 177,6 (C-4); 180,2 (C-1); 180,2 (C-5)	191	
	Ácido succínico	2,62 (H-1, <i>s</i> )	31,9 (C-1); 31,9 (C-1); 180,0 (C-2)	117	(Santana, 2017)
	Ácido fórmico	9,14 (H-1, <i>s</i> )	---	*	(Santana, 2017)
Fenólicos	Ácido gálico	7,23 (H-2, H-6, <i>s</i> )	113,3 (C-3, C-7); 142,2 (C-5); 147,7 (C-4, C-6); 169,5 (C-1)	169	(Alves, 2007)
	Tirosol	6,83 (H-1, <i>m</i> ) 7,16 (H-2, <i>m</i> )	118,3 (C-2); 133,0 (C-3)	137	(Cusano, 2018; Bartella <i>et al.</i> , 2018)
Álcool	Etanol	1,17 (H-3, <i>t</i> ) 3,63 (H-2, <i>q</i> )	19,7 (C-2); 57,5 (C-1)	*	(Oliveira, 2012)
Açúcares	Sacarose	3,9 (H-2, <i>d</i> , <i>J</i> =8,7 Hz) 5,4 (H-1, <i>d</i> , <i>J</i> =4,0 Hz)	68,9 (C-2); 94,9 (C-1); 75,4 (C-3); 106,6 (C-1')	381 [M+K] <sup>+</sup>	(Santana, 2017)
	β - Glicose	4,6 (H-1, <i>d</i> , <i>J</i> =7,8 Hz) 3,2 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =9.5:8,6 Hz)	77,2 (C-2); 78,7 (C-3); 98,8 (C-1)	219 [M+K] <sup>+</sup> 203 [M+Na] <sup>+</sup>	(Oliveira, 2012)
	α - Glicose	5,2 (H-1, <i>d</i> , <i>J</i> =3,5 Hz)	95,0 (C-1); 71,6 (C-3); 74,7 (C-5)		

Ion não detectado (Varredura 50-1000) (\*).

Os sinais referentes ao ácido cítrico foram identificados com os dois dupletos característicos em  $\delta$  2,68 e  $\delta$  2,86 com constante de acoplamento de 15,6 Hz. Os simpletos referentes aos ácidos succínico e ácido gálico foram identificados como dois singletos em  $\delta$  2,62 (s) e  $\delta$  7,23 (s), respectivamente. Foi constatada a presença do ácido fórmico por meio do seu sinal característico em  $\delta$  9,14 (s). O composto tirosol foi identificado pelos seus sinais em  $\delta$  6,83 (m) e  $\delta$  7,16 (m).

A sacarose teve seus sinais identificados em  $\delta$  3,9 (d,  $J=8,7$  Hz) e  $\delta$  5,4 (d,  $J=4,0$  Hz). Os açúcares  $\alpha$ -glicose  $\delta$  5,2 (d,  $J=3,5$  Hz) e  $\beta$ -glicose em  $\delta$  3,2 (dd,  $J=8,6:9,5$  Hz) e  $\delta$  4,6 (d,  $J=7,8$  Hz). Os sinais de  $^1\text{H}$  do etanol também foram identificados nas regiões de  $\delta$  1,17 (t) e  $\delta$  3,63 (q). Os experimentos bidimensionais, como também os espectros de massas de baixa resolução utilizados para a elucidação das 10 substâncias podem ser consultados no apêndice III deste trabalho (páginas 112 a 122).

Dentre os compostos que foram identificados nos espectros dessas bebidas, apenas o ácido fórmico e o tirosol não são naturais do fruto de araquá-boi. O tirosol é um álcool fenólico derivado da tirosina que é produzido pelas leveduras durante o processo de fermentação alcoólica (Cusano *et al.*, 2018). A literatura descreve uma ampla variedade de efeitos biológicos desse composto, como cardioprotetores, anticancerígenos, antimicrobianos neuroprotetores, efeitos endócrinos, antioxidantes e outros efeitos benéficos que tem auxiliado no crescente interesse nesse composto (Zuriarrain *et al.*, 2015; Cusano *et al.*, 2018; Markovic *et al.*, 2019). A figura 14 mostra a identificação dos compostos nos espectros de RMN.



**Figura 14.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN das cinco bebidas fermentadas de araquá-boi produzidas no estágio I. (A) Sobreposição dos espectros das cinco bebidas fermentadas; (B) Substâncias identificadas: ácido málico, ácido cítrico e ácido succínico; (C) Substâncias identificadas: Sacarose,  $\alpha$ - e  $\beta$ -glicose; (D) Substâncias identificadas: ácido gálico e tirosois (11,7 T,  $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O}$ ).

### 5.3. Quantificação por RMN

A sequência de pulsos selecionada para análise de açúcares foi a LC1PNGPPS, que possibilita supressão de mais de um sinal e uma boa relação sinal / ruído para a quantificação ( $S / N \geq 100$ ).

A supressão de mais de um sinal é importante para visualizar os sinais de hidrogênios anoméricos que são omitidos pelo solvente e álcool presentes em amostras de bebidas fermentadas alcoólicas (Furihata *et al.*, 2014; Monakhova *et al.*, 2014). A sacarose e a frutose não foram quantificadas devido à coalescência de vários sinais que levariam a um resultado incerto, uma vez que o método de quantificação por ERETIC2 requer medidas de integração de sinais da substância de interesse (Quiros *et al.*, 2016).

Para as amostras do estágio I, foram quantificados os compostos, ácido gálico e tirosol (Tabela 6). Foi observada uma excelente correlação entre o ensaio DPPH e a concentração de ácido gálico (correlação de Pearson: 0,911,  $p < 0,05$ ) nas bebidas alcoólicas desse estágio. As amostras com maior quantidade de ácido gálico foram BCE-I e BBA-I, enquanto as amostras BCE-I e ACU-I apresentaram as maiores concentrações de tirosol.

**Tabela 6.** Concentração de ácido gálico e tirosol nas bebidas fermentadas de araçá-boi por RMNq.

Código	Ácido gálico ( $\mu\text{M}$ )	Tirosol ( $\mu\text{M}$ )	Somatório - Ácido gálico e Tirosol ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
BCE-I	130,0	470,0	600,0
BRO-I	110,0	310,0	420,0
BBI-I	80,0	420,0	500,0
ACU-I	100,0	440,0	540,0
BBA-I	390,0	380,0	770,0
BBA-II-F	290,0	320,0	610,0
BBA-II-NF	290,0	580,0	870,0

As amostras dos fermentados provenientes do estágio II tiveram suas concentrações de  $\alpha$ - glicose,  $\beta$ -glicose e etanol (esses três compostos monitorados durante todo o processo de fermentação, como mostra a tabela 7).

**Tabela 7.** Dados quantitativos por RMNq de  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose e etanol das bebidas de araçá-boi durante a fermentação.

Dias	BBA-II-F				BBA-II-NF			
	mmol L <sup>-1</sup>			° G.L.	mmol L <sup>-1</sup>			° G.L.
	$\alpha$ -glicose	$\beta$ -glicose	Etanol	Etanol	$\alpha$ -glicose	$\beta$ -glicose	Etanol	Etanol
1	43,91	70,40	510,96	3,0	71,55	75,00	281,96	1,6
2	28,36	68,24	1120,78	6,5	54,77	68,98	824,54	4,8
3	22,57	46,90	1210,53	7,1	21,00	60,16	1092,49	6,4
7	21,83	14,15	1557,09	9,1	4,15	16,26	1641,59	9,6
8	8,70	9,65	1744,33	10,2	3,22	5,40	1717,06	10,0
9	2,79	9,62	1789,13	10,4	1,63	4,93	1863,86	10,9
10	3,38	9,54	1873,99	10,9	1,37	3,39	1910,2	11,2
11	1,90	7,83	1944,53	11,4	0,76	NQ	2132,25	12,5
21	0,30	3,40	2173,78	12,7	0,62	NQ	2373,93	13,9

ND – Não Quantificado.

O fermentado BBA-II-NF não apresentou quantidades quantificáveis de  $\beta$ -glicose a partir do décimo primeiro dia, mas  $\alpha$ -glicose foi encontrada a concentração de 0,62 mmolL<sup>-1</sup>. Já na amostra do fermentado BBA-II-F foi determinada a concentração de  $\alpha$ -glicose equivalente a 0,3 mmol L<sup>-1</sup>. Com relação ao açúcar  $\beta$ -glicose, foi possível determinar na amostra BBA-II-F a concentração de 3,4 mmol L<sup>-1</sup>.

A quantidade de etanol também foi determinada na amostra, sendo observado que na amostra não filtrada BBA-II-NF foi constatada a maior concentração de etanol, equivalente a 2,37 molL<sup>-1</sup> (13,9 °G.L.). A tabela 7 mostra os valores das concentrações dos açúcares  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose e etanol no período de 21 dias de fermentação. O elevado teor de etanol pode ser devido a maior disponibilidade de particulados do fruto presentes nas amostras não filtradas (Meillon *et al.*, 2010; Lemos *et al.*, 2019). A amostra proveniente do fermentado BBA-II-F obteve o valor de concentração de etanol de 2,17 mol L<sup>-1</sup> (12,7 °G.L.). Uma possível explicação para a discrepância entre os valores de açúcares e álcool presentes nas bebidas deve-se ao fato que a quantidade de

etanol produzido pelas leveduras está associada ao teor de qualquer matéria orgânica disponível no meio, tais como carboidratos (Tortora *et al.*, 2012).

As bebidas fermentadas derivadas do planejamento fatorial apresentam concentrações elevadas do composto tirosol, no qual algumas bebidas obtiveram o triplo das concentrações obtidas nos estágios I e II. É importante destacar que as bebidas fermentadas que apresentaram as médias das concentrações  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (C28F:  $920,0 \pm 0,04$ , C28NF:  $861,75 \pm 0,01$ , B28NF:  $842,2 \pm 0,02$  e B28F:  $835,3 \pm 0,04$ ) mais elevadas de tirosol foram também as amostras obtidas com a temperatura fixada em  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o que destaca a importância do fator temperatura para a produção destas bebidas (Tabela 8).

**Tabela 8.** Tabela de concentrações do tirosol e etanol das amostras provenientes do planejamento fatorial completo.

Amostras	Tirosol ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Etanol ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$^{\circ}\text{G.L.}$
B18F	$685,7 \pm 0,02^c$	$2222,2 \pm 0,3^a$	13,0
C18NF	$796,7 \pm 0,03^b$	$2333 \pm 0,0^a$	13,6
C18F	$813,3 \pm 0,02^b$	$2203,1 \pm 0,6^a$	12,9
B18NF	$832,5 \pm 0,02^b$	$2233,9 \pm 0,0^a$	13,1
B28F	$835,3 \pm 0,04^b$	$2127,6 \pm 0,3^a$	12,4
B28NF	$842,2 \pm 0,02^b$	$2176,6 \pm 0,1^a$	12,7
C28NF	$861,75 \pm 0,01^{ab}$	$1972,5 \pm 0,1^a$	11,5
C28F	$920,0 \pm 0,04^a$	$2032,5 \pm 0,0^a$	11,9

Resultados com média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas. Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo ( $p < 0,05$ ).

O tirosol foi determinado em muitas bebidas fermentadas alcoólicas, como por exemplo, os vinhos tintos espanhóis Jerez vinhos tintos espanhóis Jerez ( $147,5 - 321,0\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ), o vinho branco Suavia 'Le Rive' ( $123,4\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ), os vinhos brancos espanhóis ( $73,4 - 179,2\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ), Merlot espanhol ( $226,9\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e em Cidras ( $107,1 - 193,2\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Gomez-Miguez *et al.*, 2007; Thirunavukkarasu *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2011; Pineiro *et al.*, 2011; Zuriarrain *et al.*, 2015). Ao comparar as concentrações do tirosol presente nas bebidas fermentadas de araçá-boi, com as concentrações relatadas na literatura, sua concentração é significativa, até mesmo para as bebidas produzidas nos estágios

I e II, onde se apresentaram com valores menores, quando comparadas com as bebidas obtidas do planejamento fatorial.

A literatura descreve que vinhos brancos (produzidos sem as cascas das uvas que contém grande concentração de polifenóis) podem fornecer propriedades de cardioproteção semelhante à dos vinhos tintos (fermentados com as cascas e sementes das uvas), mesmo contendo quantidades menores de polifenóis, mas apresentando elevadas concentrações do tirosol, demonstrando o quão relevante é a capacidade antioxidante desse composto (Bertelli *et al.*, 2002; Dudley *et al.*, 2012).

Com relação às concentrações de etanol nas bebidas derivadas do planejamento fatorial completo, as mesmas permaneceram com valores elevados. Essas bebidas são estatisticamente idênticas, do ponto de vista do teor alcoólico, mantendo a concentração de álcool entre 11,5 °G.L. (C28NF) e 13,6 °G.L. (C18NF). A porcentagem de álcool nessas bebidas está dentro do limite para a classificação de bebidas fermentadas de frutos, o qual determinado como sendo quatorze por cento (14 %) em volume (Brasil, 1994).

#### **5.4. Resultados dos Ensaio Antioxidantes**

A correlação entre os ensaios DPPH e FT para bebidas fermentadas BBA-II-F e BBA-II-NF mostrou-se elevada (Pearson 0,863,  $p < 0,05$ ) e excelente para concentrações do composto fenólico tirosol na frente de FT (Pearson 0,951,  $p < 0,05$ ) e ensaios com DPPH (Pearson 0,935,  $p < 0,05$ ). Portanto, a concentração de tirosol refletiu a resposta antioxidante, apresentando a influência do processo de filtração na composição química e na resposta antioxidante. Observou-se que as amostras com maior teor de compostos fenólicos (ácido gálico e tirosol) foram BBA-I e BBA-II-NF, respectivamente.

Os ensaios antioxidantes foram realizados antes (ensaios para as amostras dos estágios I e II) e após o experimento do planejamento fatorial completo, para efeitos comparativos. Os resultados obtidos por meio dos ensaios antioxidantes de DPPH e Fenóis Totais das amostras nos estágio I (Tabela 9) revelaram que as

amostras que obtiveram melhor resposta para o ensaio de DPPH ( $\mu\text{mol ET L}^{-1}$ ) apresentaram uma boa correlação com o ensaio de determinação de FT ( $\text{mg EAG L}^{-1}$ ).

**Tabela 9.** Atividade antioxidante das bebidas fermentadas de frutos de araçá-boi obtidas no estágio I de produção.

Código	Período de coleta	FT (mg EAG L-1)	DPPH ( $\mu\text{mol ET L}^{-1}$ )
BCE-I		620,4 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>	589,4 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>
BRO-I		675,6 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup>	583,3 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>
ACU-I	Novembro de 2017	1048,0 $\pm$ 8,0 <sup>c</sup>	563,4 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>
BBA-I		641,1 $\pm$ 8,7 <sup>c</sup>	535,4 $\pm$ 3,1 <sup>c</sup>
BBI-I		599,7 $\pm$ 8,7 <sup>d</sup>	511,4 $\pm$ 5,3 <sup>d</sup>
BBA-II-F	Março de 2018	306,5 $\pm$ 3,9 <sup>e</sup>	281,4 $\pm$ 2,3 <sup>e</sup>
BBA-II-NF		347,9 $\pm$ 8,6 <sup>f</sup>	307,4 $\pm$ 7,5 <sup>f</sup>

Resultados com média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas, mg EAG  $\text{g}^{-1}$  = miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de extrato;  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  = micromols de equivalente de Trolox por grama de extrato; Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo ( $p < 0,05$ ).

As respostas antioxidantes das bebidas alcoólicas para o estágio I mostraram os maiores valores no ensaio DPPH para as amostras ACU-I, BCE-I e BRO-I. Esses resultados corroboram com os obtidos no teste Fenóis Totais, com exceção da amostra BBA-I. A capacidade antioxidante medida pelo ensaio DPPH e o teor de FT observados nessas bebidas podem ser atribuídos à presença dos compostos fenólicos, ácido gálico e tirosol (Asnaashari et al., 2014), bem como a outros compostos fenólicos que não foram determinados devido à complexidade da matriz (Khaledi et al., 2011; Kulichova et al., 2018; Pavun et al., 2018). Esses resultados, associados a concentração dos compostos fenólicos (ácido gálico + tirosol) e ao resultado da análise preferencial de aroma e sabor contribuíram para a escolha da levedura Biolievito Bayanus que foi utilizada no estágio II.

As respostas antioxidantes para o estágio II foram estatisticamente inferiores ao estágio I, provavelmente esta diferença está relacionada a diferentes períodos de colheita. Além disso, as respostas antioxidantes entre as amostras BBA-II-F e BBA-II-NF também foram estatisticamente diferentes, bem como o conteúdo fenólico total observado para elas.

A análise dos resultados dos ensaios antioxidantes das amostras obtidas pelo planejamento fatorial completo revelou que as amostras que se destacaram na análise preferencial são também as amostras que obtiveram elevada resposta para atividade antioxidante (Tabela 10). As amostras que apresentaram as melhores respostas antioxidantes foram àquelas submetidas ao processo de Não-Filtragem (com exceção a amostra da bebida C28F) o que demonstra a relevância do parâmetro para a atividade antioxidante do produto. A amostra de C28F obteve a melhor resposta para o ensaio de DPPH /  $Cl_{50}$  ( $484,56 \pm 10,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e ABTS ( $1263,5 \pm 13,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Já para o ensaio de Fenóis Totais, destacou-se a amostra B18NF ( $127,31 \pm 4,6 \text{ mg EAG L}^{-1}$ ), seguida da amostra de C18NF ( $119,3 \pm 2,8 \text{ mg EAG L}^{-1}$ ).

A elevada atividade antioxidante destas amostras pode ser atribuída à presença de ácido gálico e tirosol nas amostras, que possuem elevada atividade antioxidante descrita na literatura (Iranifam e Al Lawati, 2019; Paradiso *et al.*, 2019).

**Tabela 10.** Atividade antioxidante das bebidas fermentadas de frutos de araçá-boi obtidas por meio do planejamento fatorial completo.

<b>Códigos</b>	<b><math>Cl_{50}</math> (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>ABTS (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>FT (mg EAG <math>L^{-1}</math>)</b>
B18NF	$624,90 \pm 16,9^{ab}$	$1267,0 \pm 40,0^{c''}$	$126,31 \pm 4,6^a$
C28NF	$543,8 \pm 35,9^{cd}$	$917,2 \pm 46,1^{b''}$	$114,9 \pm 1,1^{ab'}$
C18NF	$511,66 \pm 6,9^{de}$	$874,7 \pm 30,3^{b''}$	$119,7 \pm 2,8^{ab'}$
B28NF	$504,97 \pm 35,9^{de}$	$846,0 \pm 17,1^{b''}$	$119,2 \pm 4,9^{ab'}$
C18F	$585,55 \pm 5,3^{bc}$	$667,2 \pm 15,0^{b''}$	$106,6 \pm 10,8^{bc'}$
C28F	$484,56 \pm 10,6^e$	$1263,5 \pm 13,7^{c''}$	$110,3 \pm 9,0^{abc'}$
B18F	$657,0 \pm 19,1^a$	$176,0 \pm 44,5^{a''}$	$97,1 \pm 1,1^c$
B28F	$633,20 \pm 14,59^{ab}$	$703,5 \pm 10,8^{b''}$	$108,1 \pm 3,0^{bc'}$

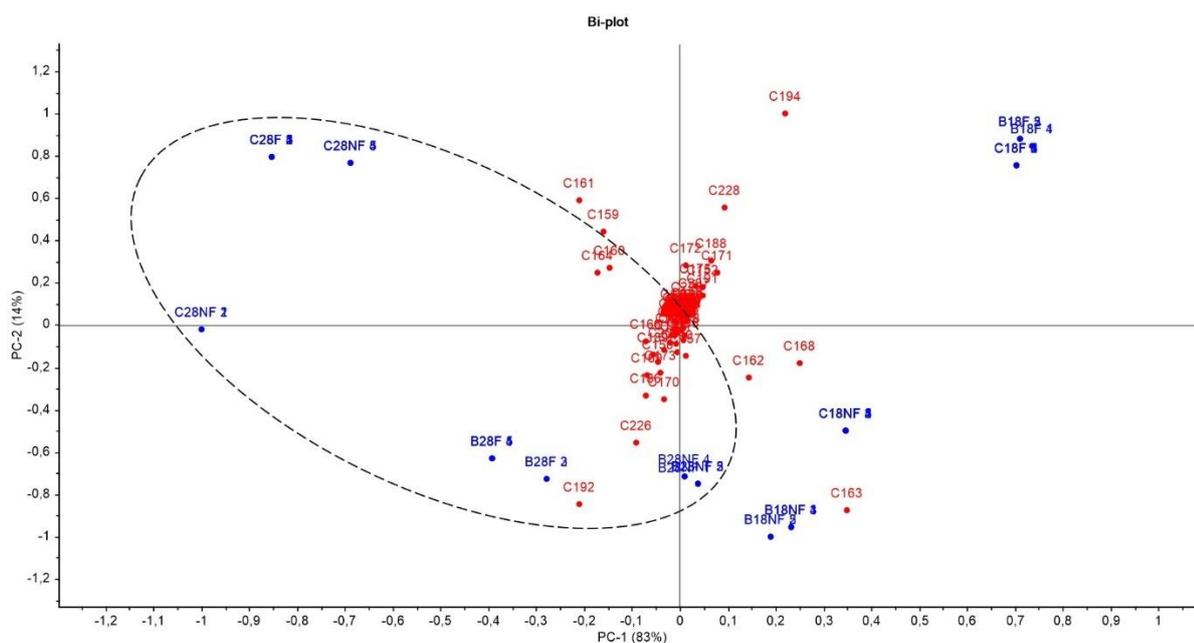
Resultados com média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas. Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo ( $p < 0,05$ ).

## 5.5. Análises Quimiométricas dos Dados

A matriz I (de 0,5 a 11,0 ppm) foi analisada por PCA, observando-se a formação de distribuições distintas dos *loadings* (*buckets*), no qual as réplicas

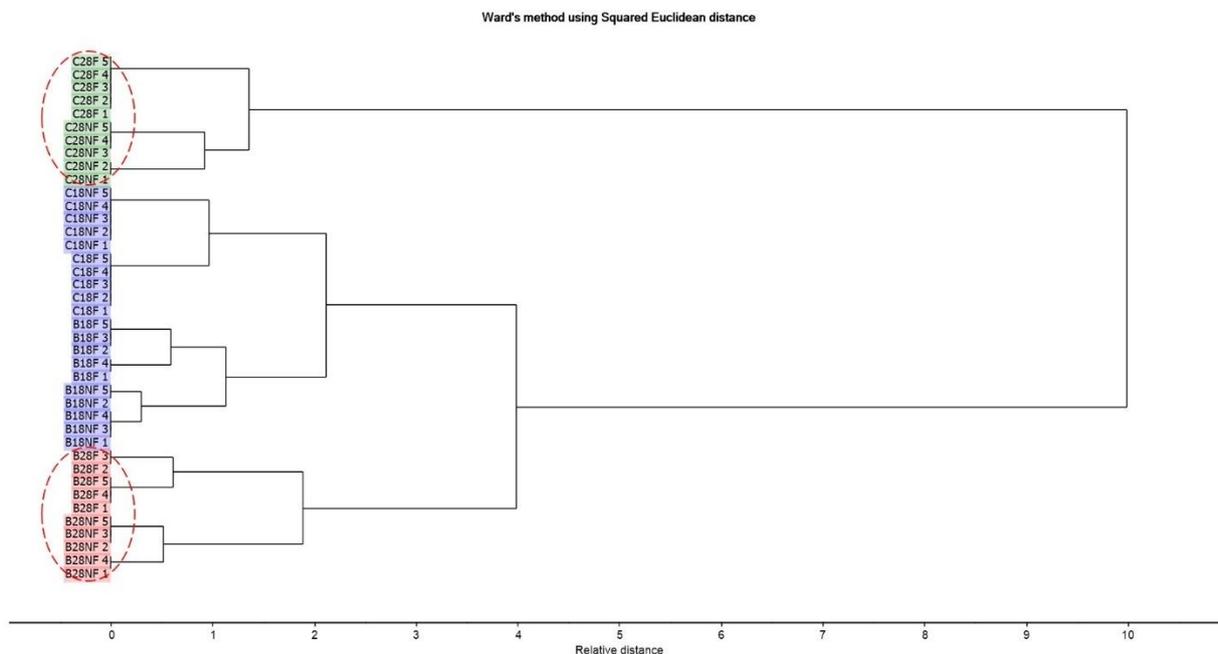
estão próximas. Em PC1 (83%) é possível observar a diferenciação entre as amostras de acordo com seus processos de produção, no qual as amostras obtidas com a temperatura fixada em 28 °C foram destacadas no gráfico tipo Boxplot. Essa separação também pode ser interpretada como sendo a distinção de amostras com diferentes concentrações do composto tirosol, no qual as amostras que apresentaram as maiores concentrações do mesmo são destacadas no gráfico da figura 15.

Por PC2 (14%) é possível observar a distinção das duas amostras que apresentaram as maiores concentrações de tirosol (C28F e C28NF) presentes no quadrante positivo.



**Figura 15.** Gráfico Biplot (*Scores e Loadings*) obtidos por PCA (PC1 = 83%; PC2 = 14%) da região de 0,5 a 11,0 ppm das amostras dos oito tipos de bebidas fermentadas obtidas pelo planejamento fatorial.

O HCA mostra que esse conjunto de dados tende a formar três grupos principais. Observa-se que as amostras C28F e C28NF são agrupadas, e as amostras e B28F e B28NF também seguem próximas, como foi apresentado na PCA. As amostras provenientes do processo de produção que fixou a temperatura de fermentação em 18 °C permaneceram concentradas no *cluster* central. Os agrupamentos apresentados na HCA mostram que os agrupamentos foram formados de acordo com o que foi apresentado em PCA.

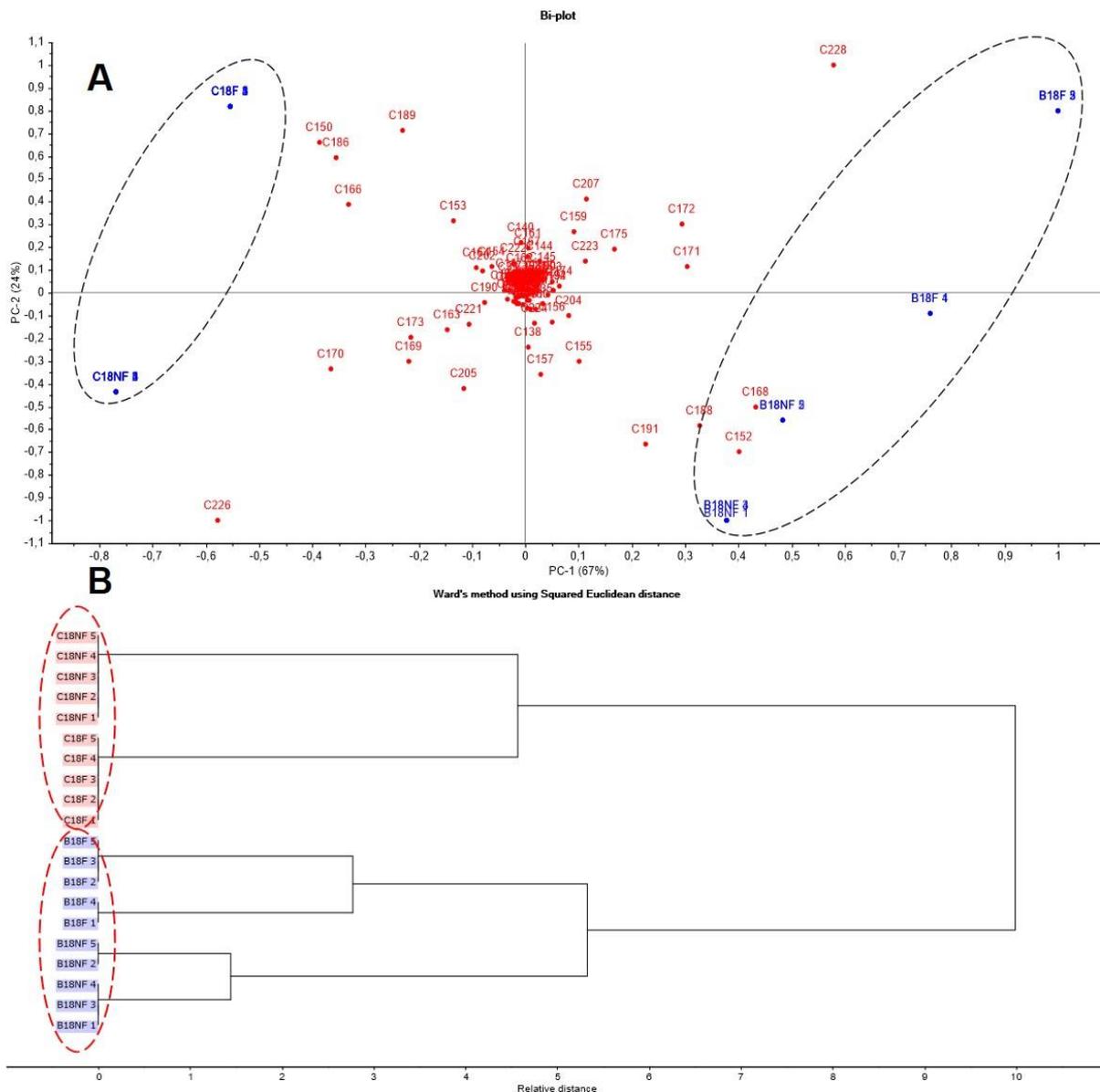


**Figura 16.** Dendrograma obtido por HCA da região de 0,5 a 11,0 ppm das amostras dos oito tipos de bebidas fermentadas obtidas pelo planejamento fatorial.

Os *buckets* 159 ( $\Delta\delta$  4,1059-4,0629), 161 ( $\Delta\delta$  4,0522-4,0049), 162 ( $\Delta\delta$  4,0049-3,9424), 192 ( $\Delta\delta$  2,657-2,6012) e 228 ( $\Delta\delta$  0,9079-0,827) foram os principais responsáveis pela diferenciação das amostras das bebidas C28F e C28NF. Esses *buckets* são referentes a sinais de elevada intensidade, localizados principalmente na região de hidrogênios anoméricos, o que demonstra uma maior concentração de açúcares nessas duas bebidas.

O reconhecimento de padrões de agrupamento se torna mais fácil a partir da análise das matrizes II e III, onde foram divididos os dados das amostras de acordo com a temperatura utilizada no processo.

Na figura 17 são apresentados os gráficos de PCA e HCA da matriz II (dados das amostras obtidas com temperatura de 18 °C). Em PC1 (67%) observa-se claramente a separação das amostras de acordo com o tipo de levedura empregada no processo (amostras produzidas com a levedura Arom Cuvee concentradas a esquerda e as produzidas com a levedura Biolievito Bayanus concentradas a direita). A PC2 (24%) faz distinção das amostras de acordo com o processo de filtração (amostras filtradas concentradas na parte superior do gráfico e as bebidas não-filtradas concentradas na parte inferior).

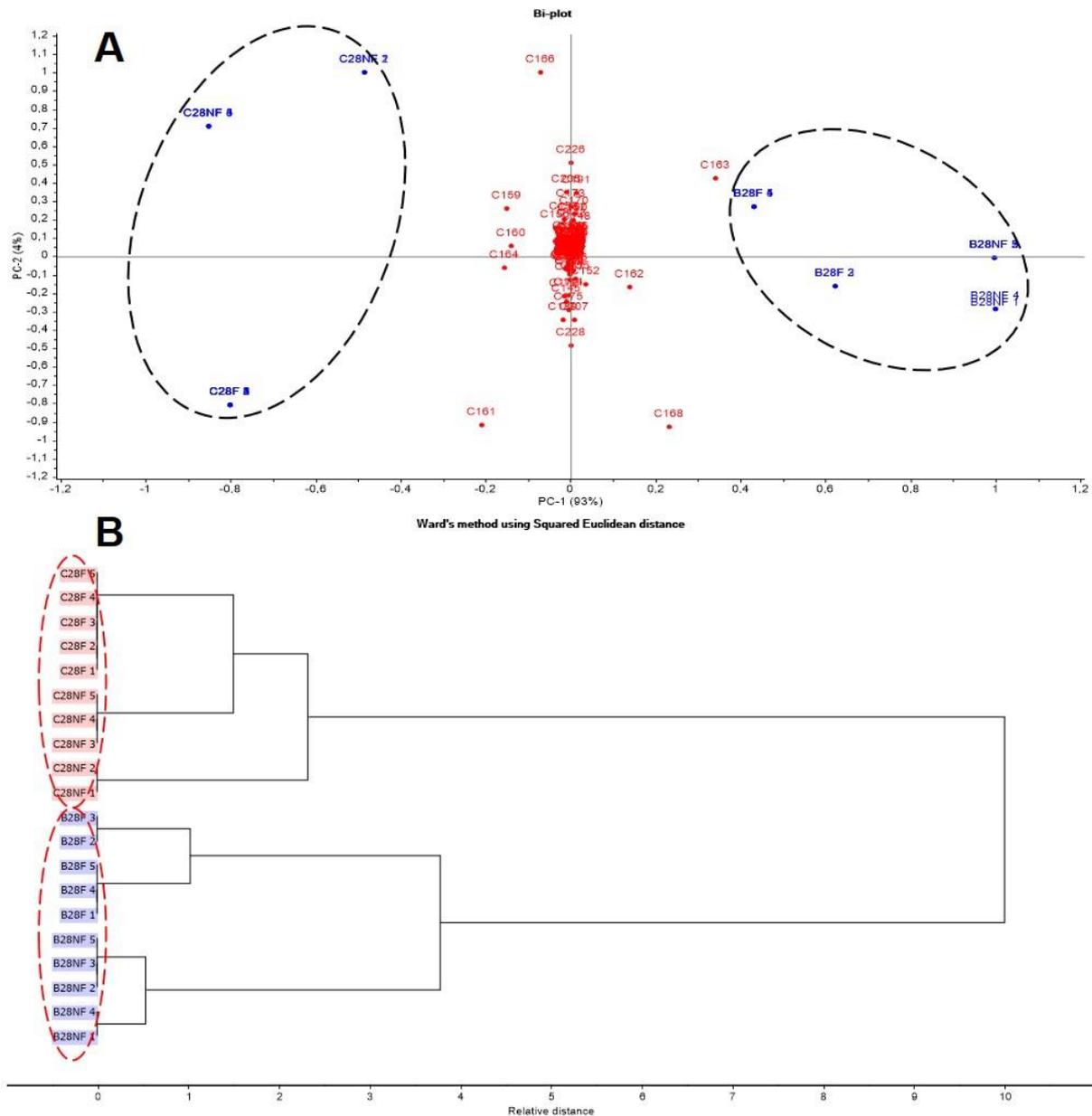


**Figura 17. A.** Gráfico Biplot (*Scores* e *Loadings*) obtidos por PCA (PC1 67% e PC2 24%); **B.** dendograma obtido por HCA da região de 0,5 a 11,0 ppm das amostras dos oito tipos de bebidas fermentadas obtidas pelo planejamento fatorial, com temperatura fixada em 18 °C.

Com relação ao HCA, se torna evidente a formação de dois *clusters* separando as amostras de acordo com o tipo de levedura utilizada no processo, o que mostra que o tipo de levedura é o principal fator responsável pela diferenciação das bebidas.

Ao analisar separadamente também os espectros das amostras obtidas com a temperatura fixa de 28 °C é possível observar a formação dos dois *clusters*

dividindo as amostras de acordo com os tipos de leveduras utilizadas no processo. Tais resultados corroboram com o que foi apresentado para os dados da matriz II.



**Figura 18.** Gráfico Biplot (*Scores* e *Loadings*) obtidos por PCA (PC1 93% e PC2 4%); **B.** dendograma obtido por HCA da região de 0,5 a 11,0 ppm das amostras dos oito tipos de bebidas fermentadas obtidas pelo planejamento fatorial, com temperatura fixada em 28 °C.

Os *buckets* que tiveram destaque para a diferenciação das amostras, tanto para a matriz II, quanto para a III foram o 150 ( $\Delta\delta$  4,5034-4,4662), 159 ( $\Delta\delta$  4,1059-

4,0629), 161 ( $\Delta\delta$  4,0522-4,0049), 162 ( $\Delta\delta$  4,0049-3,9424), 166 ( $\Delta\delta$  3,8475-3,8094), 170 ( $\Delta\delta$  3,5747-3,5091), 171 ( $\Delta\delta$  3,5091-3,4554) e 191 ( $\Delta\delta$  2,6906-2,657).

Tais *buckets* se referem a sinais de elevada intensidade, localizados na região dos açúcares (Ramos *et al.*, 2015). Esses dados revelam que apesar das amostras das bebidas apresentarem um perfil químico bastante similar, as mesmas podem ser diferenciadas pelas intensidades dos sinais nos espectros, o que demonstra uma diferenciação de acordo com as concentrações dos compostos presentes nas bebidas fermentadas.

## 5.6. Cálculos de efeitos do Planejamento fatorial completo

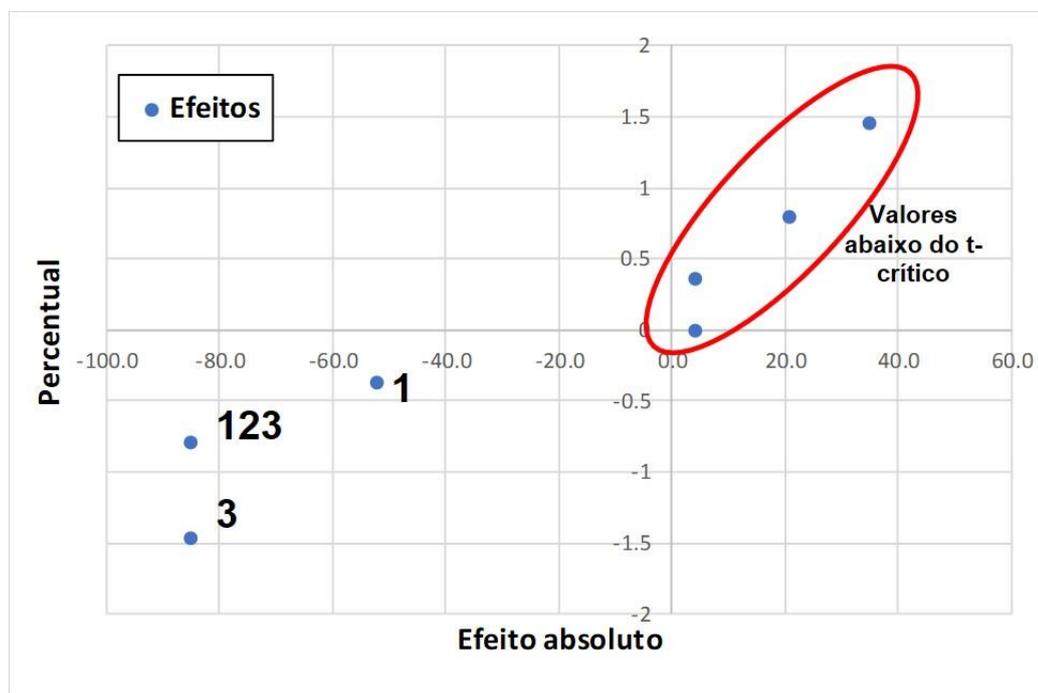
Na tabela 11 são apresentados os cálculos das contribuições individuais dos fatores e suas interações para os ensaios antioxidantes. Observa-se que o fator 3 (Temperatura) apresenta a porcentagem de 38,3 % de significância para os ensaios de DPPH ( $CI_{50}$ ), seguido pelo valor do efeito 123 (38,3 %), proveniente da interação dos três fatores. Para o ensaio de Fenóis Totais, destaca-se o efeito do fator 1 (Tipo de Levedura) com 11,9% de significância e o efeito 23 (72,5%). Já para o ensaio de ABTS, destaca-se a interação entre os fatores 2, com 31,3% de significância, seguido pelas interações 12 (31,3%) e 23 (22,3 %). Os valores de efeito são considerados como sendo significativos pela avaliação do seu **t-crítico**. Todos os efeitos que tenham seu valor (em módulo) menores que o seu t-crítico, são considerados não significativos no planejamento (Filho, 2015).

**Tabela 11.** Contribuição individual dos fatores e suas interações na resposta antioxidante.

Cl <sub>50</sub>			FT			ABTS					
Efeito (E)	E <sup>2</sup>	(%) do E <sup>2</sup> /ΣE <sup>2</sup>	Efeito (E)	E <sup>2</sup>	(%) do E <sup>2</sup> /ΣE <sup>2</sup>	Efeito (E)	E <sup>2</sup>	(%) do E <sup>2</sup> /ΣE <sup>2</sup>			
3	-84,9	3607,9	38,3	1	-3,5	12,3	11,9	3	-134,1	17991,5	3,3
123	-84,9	3607,9	38,3	3	0,1	0,0	0,0	123	-134,1	17991,5	3,3
1	-52,1	1358,5	14,4	123	0,1	0,0	0,0	1	114,2	13034,2	2,4
2	4,2	8,8	0,1	13	2,2	4,9	4,8	13	180,0	32399,1	6,0
12	4,2	8,8	0,1	2	2,4	5,6	5,4	23	347,5	120744,1	22,3
13	20,6	213,2	2,3	12	2,4	5,6	5,4	2	411,7	169470,1	31,3
23	34,7	603,5	6,4	23	8,6	74,7	72,5	12	411,7	169470,1	31,3
<b>Soma</b>	<b>9408,6</b>	<b>100,0</b>		<b>Soma</b>	<b>102,974</b>	<b>100,0</b>		<b>Soma</b>	<b>541100,72</b>	<b>100,0</b>	

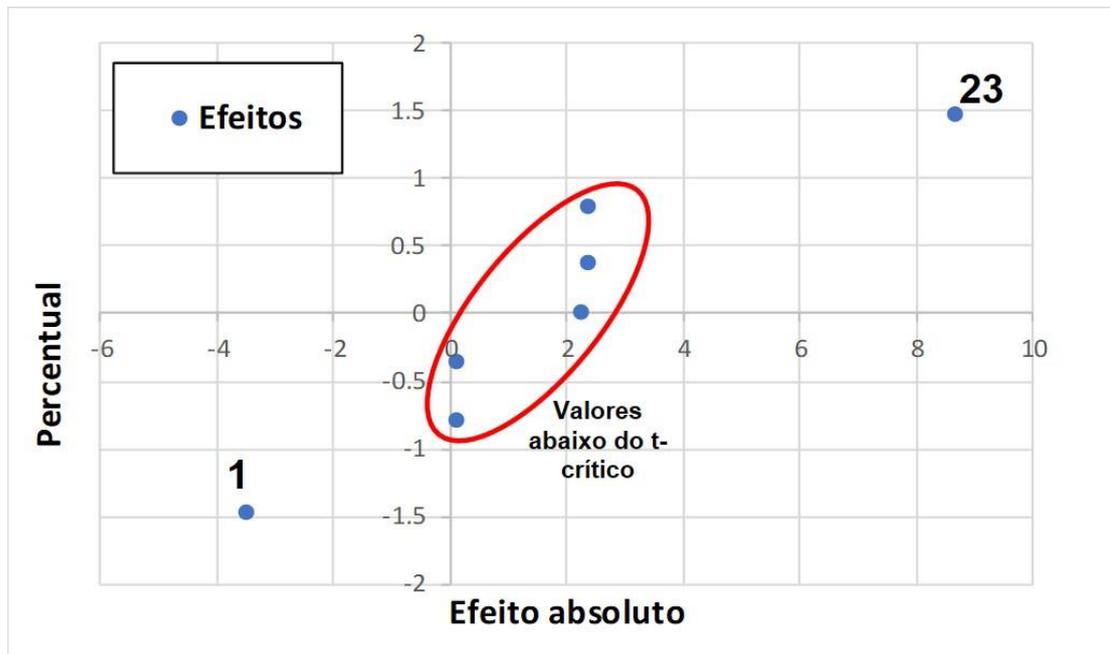
Valores de t-crítico calculado - DPPH: 42,8; Fenois Totais: 3,0; ABTS: 185,1.

O gráfico de efeito para o ensaio de DPPH mostra que as interações 1, 123 e principalmente a 3 se distanciam do zero (efeitos delimitados pela elipse), o que demonstra que as mesmas apresentam efeitos estatisticamente mais significativos (Figura 25). O efeito mais significativo para o ensaio de DPPH foi o da variável 3 (temperatura).



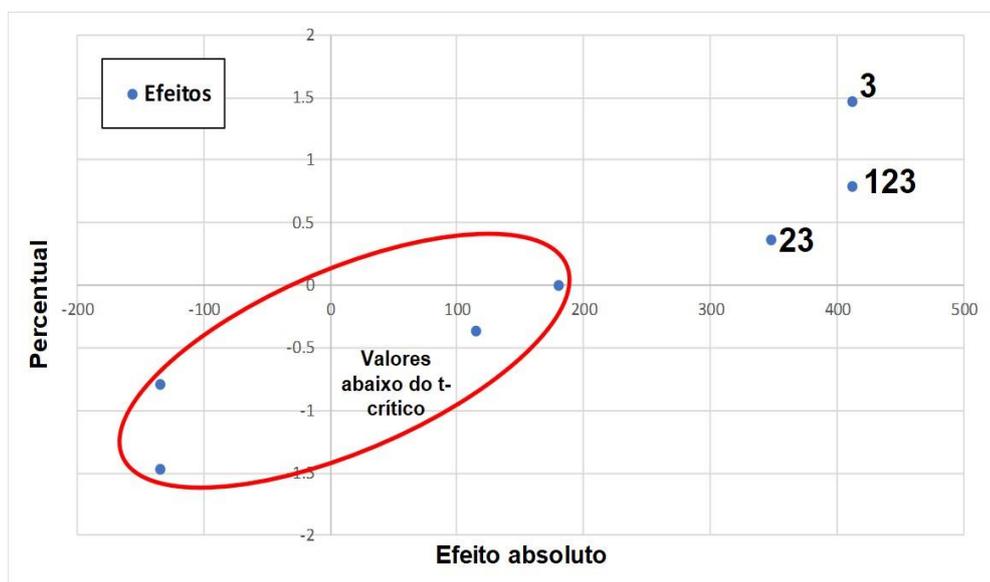
**Figura 19.** Análise dos efeitos absolutos para o planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) para a resposta de atividade antioxidante para o ensaio de DPPH (intervalo de confiança 95%).

O gráfico de efeito para o ensaio de Fenóis Totais mostra que as interações 23 e 1 se distanciam do zero (efeitos delimitados pela elipse), o que demonstra que as mesmas apresentam efeitos mais significativos. O efeito mais significativo para o ensaio de Fenóis Totais foi o derivado da variável 1 (tipo de levedura).



**Figura 20.** Análise dos efeitos absolutos para o planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) para a resposta de atividade antioxidante para o ensaio de Fenóis Totais (intervalo de confiança 95%).

O gráfico de efeito para o ensaio de ABTS mostra que as interações 123, 23, mas principalmente a 3 distanciaram-se do zero (efeitos delimitados pela elipse), o que demonstra que as mesmas apresentam os efeitos mais significativos para o resultado do ensaio antioxidante (Figura 26). O efeito mais significativo para o ensaio de ABTS foi o derivado da variável 3 (temperatura).



**Figura 21.** Análise dos efeitos absolutos para o planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) para a resposta de atividade antioxidante para o ensaio de ABTS (intervalo de confiança 95%).

A análise dos cálculos de efeitos das variáveis e suas interações obtidas por do planejamento experimental mostrou que a variável mais significativa para a resposta da atividade antioxidante foi a Temperatura (3) de produção, seguida pela interação entre as variáveis Levedura e Temperatura (interação 13) considerando os resultados dos três ensaios realizados.

Diante dos resultados apresentados pelo planejamento fatorial, o fator que menos contribui para a resposta antioxidante, considerando-se a média dos três ensaios, foi o tipo de levedura utilizada e a temperatura foi o mais relevante dentre os que foram analisados. Ter conhecimento de parâmetros relevantes e nem tão relevantes em um processo é essencial para redução do número de experimentos, possibilitando a economia de recursos para o desenvolvimento da pesquisa (Esbensen *et al.*, 2018).

Com relação aos cálculos de efeito para as concentrações de tirosol nas bebidas fermentadas, observa-se que os efeitos 1, 2 e a interação 12 apresentam 77,6 % de significância para os dados de concentração do tirosol (Tabela 12). Com exceção da interação 13, os demais efeitos são todos significativos ( $> t$ -crítico).



## 6. CONCLUSÃO

O estudo de nivelamento realizado (estágios I e II) possibilitou a seleção de leveduras do tipo Arom Cuvee e Biolietivo Bayanus e do processo de filtração com o melhor flavor e melhores respostas antioxidantes. Esse nivelamento possibilitou a construção de um planejamento fatorial completo de  $2^3$ . Durante o processo de produção das bebidas fermentadas foi possível determinadas suas características físico-químicas, como o pH, o teor de sólidos solúveis e o teor alcoólico.

A utilização de técnicas espectrométricas sofisticadas assistidas por bases de dados robustas possibilitaram a identificação de dez compostos presentes nas bebidas fermentadas de araçá-boi: ácidos málico, cítrico, gálico, succínico e fórmico, além de tirosol, sacarose,  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose e etanol. A identificação destes constituintes auxiliou na diferenciação dos constituintes por análises quimiométricas por meio da variação das concentrações das principais substâncias identificadas. O método de quantificação empregado (RMNq) possibilitou a determinação das concentrações dos constituintes majoritários presentes, confirmando que a diferenciação das amostras das bebidas se deve a concentração dos constituintes, sugerido pelas análises quimiométricas. A quantificação de constituintes antioxidantes (ácido gálico e tirosol) possibilitou uma melhor compreensão das capacidades antioxidantes dessas bebidas.

Análise estatística dos resultados antioxidantes evidenciou que as amostras que apresentaram as melhores capacidades antioxidantes foram C28F para o ensaio de DPPH /  $CI_{50}$  ( $484,56 \pm 10,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ABTS ( $1263,5 \pm 13,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e Fenóis Totais ( $127,31 \pm 4,6 \text{ mg EAG L}^{-1}$ ), seguida por C18NF ( $119,3 \pm 2,8 \text{ mg EAG L}^{-1}$ ). A elevada atividade antioxidante dessas bebidas foi atribuída à presença da substância fenólica tirosol. Com relação aos resultados dos cálculos de efeito do planejamento adotado, o fator que mais contribui para a resposta antioxidante foi a temperatura empregado no processo fermentativo e o fator menos relevante foi o tipo de levedura empregada. Esses resultados demonstram as melhores condições de obtenção das bebidas fermentadas de araçá-boi, com base nas respostas antioxidantes, é a utilização da levedura

Biolietivo Bayanus, com o processo de Não-filtração fermentada a 18 °C. Diante do que foi apresentado, este trabalho contribui com o conhecimento de um processo de produção otimizado de bebidas fermentadas de araçá-boi, bem como descreve a composição química e suas capacidades antioxidantes desses produtos amazônicos.

## 7. REFERÊNCIAS

- AKOKA, S.; BARANTIN, L.; TRIERWEILER, M. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Analytical Chemistry*, v. 71, n. 13, p. 2554-2557, 1999.
- AKOKA, S.; TRIERWEILER, M. Improvement of the ERETIC method by digital synthesis of the signal and addition of a broadband antenna inside the NMR probe. *Instrumentation Science & Technology*, v. 30, n. 1, p. 21-29, 2002.
- ALVES, C. Q. Flavonóides e antioxidantes derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma gardnerianum* TUL. (Leguminosae). (Dissertação). Química, Universidade Federal da Bahia, 108, 2007.
- ALVES, E. G. *et al.* H-1 NMR and LC-MS-based metabolomic approach for evaluation of the seasonality and viticultural practices in wines from Sao Francisco River Valley, a Brazilian semi-arid region. *Food Chemistry*, v. 289, p. 558-567, 2019.
- ANJOS, A. M. G. Morphology, germination and water content of seeds of Araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. Sororia). 29: 11 p. 1999.
- ANVISA. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. SANITÁRIA, A. N. D. V.: 12 p. 2004.
- ASNAASHARI, M.; FARHOOSH, R.; SHARIF, A. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*, v. 159, p. 439-444, 2014.
- AULA, S. *et al.* Biophysical, biopharmaceutical and toxicological significance of biomedical nanoparticles. *Rsc Advances*, v. 5, n. 59, p. 47830-47859, 2015.
- BAGETTI, M. *et al.* Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. *Ciencia Rural*, v. 39, n. 8, p. 2504-2510, 2009.
- BAILAO, E. *et al.* Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 10, p. 23760-23783, 2015.

BARANTIN, L.; LEPAPE, A.; AKOKA, S. A new method for absolute quantitation of MRS metabolites. *Magnetic Resonance in Medicine*, v. 38, n. 2, p. 179-182, 1997.

BARISAN, L. *et al.* How Does Carbon Footprint Create Shared Values in the Wine Industry? Empirical Evidence from Prosecco Superiore PDO's Wine District. *Sustainability*, v. 11, n. 11, p. 13, 2019.

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. *Oxidants and Antioxidants*, Pt A, v. 299, p. 15-27, 1999.

BERTELLI, A. A. E. *et al.* Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine. *Alcohol and Wine in Health and Disease*, v. 957, p. 295-301, 2002.

BISSON, L. F. Biotechnology of wine yeast. *Food Biotechnology*, v. 18, n. 1, p. 63-96, 2004.

BOEIRA, L. S.; FREITAS, P. H. B.; UCHÔA, N. R.; BEZERRA, J. A. *et al.* Chemical and sensorial characterization of novel alcoholic beverage produced with native acai (*Euterpe precatoria*) from different region of the Amazonas state. *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier: Elsevier. 117 2020.

BONNEAU, N. *et al.* H-1 qNMR Quantification of Annonaceous Acetogenins in Crude Extracts of *Annona muricata* L. Fruit Pulp. *Phytochemical Analysis*, v. 28, n. 4, p. 251-256, 2017.

BRANDWILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use Of A Free-Radical Method To Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Lei Nº 7.678/88. Casa Civil: Subchefia para Assuntos Jurídicos: 12 p. 1988.

BRASIL. Lei Nº 8.918, de 14 de julho de 1994 21 p. 1994.

CARDOSO, L. D. *et al.* Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2151-2154, 2011.

CAVALCANTE, P. B. Frutas Comestíveis na Amazônia. 05. 1991. 166.

CHIDI, B. S.; BAUER, F. F.; ROSSOUW, D. Organic Acid Metabolism and the Impact of Fermentation Practices on Wine Acidity - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, v. 39, n. 2, p. 315-329, 2018.

CLYNES, R. A. *et al.* Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine*, v. 6, n. 4, p. 443-446, 2000.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L - (Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, n. 1, p. 33-39, 1999.

CONTRERAS-CALDERON, J. *et al.* Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2047-2053, 2011.

CORREIA, R. T. P. *et al.* Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Science and Technology International*, v. 18, n. 6, p. 539-547, 2012.

CUELLAR, F. A. Antioxidant capacity of araza (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) during the ripening. *Revista Colombiana De Quimica. Revista Colombiana De Quimica*. 42: 08 p. 2013.

CUSANO, E.; SIMONATO, B.; CONSONNI, R. Fermentation process of apple juice investigated by NMR spectroscopy. *Lwt-Food Science and Technology*, v. 96, p. 147-151, 2018.

DANTAS, C. E. A.; SILVA, J. L. A. Umbu Wine: Production, Fermentative Kinetics And Physicochemical Characterization. *Holos*, v. 33, n. 2, p. 108-121, 2017.

DAS, N. P.; PEREIRA, T. A. Effects Of Flavonoids On Thermal Autoxidation Of Palm Oil - Structure-Activity-Relationships. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 67, n. 4, p. 255-258, Apr 1990.

DAZA, L. D. *et al.* Functional properties of encapsulated Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extract. *Food Bioscience*, v. 18, p. 15-21, 2017.

DEBORDE, C. *et al.* Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 102, p. 61-97, 2017.

DENARDIN, C. C. *et al.* Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26: 07 p. 2006.

DUDLEY, J. I. *et al.* Does White Wine Qualify for French Paradox? Comparison of the Cardioprotective Effects of Red and White Wines and Their Constituents: Resveratrol, Tyrosol, and Hydroxytyrosol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 10, p. 2767-2767, 2012.

EINBOND, L. S. *et al.* Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

ESBENSEN, K. H. *et al.* Multivariate Data Analysis: An Introduction to Multivariate Analysis Process Analytical Technology and Quality by Design. 06. *CAMO Software AS: CAMO*, 2018.

FERREIRA, A. S. Elaboração de fermentado alcoólico de araçá-boi (*Eugenia stipitata*). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Rondônia, *Trabalho de Conclusão de Curso*, 2014.

FILHO, E. R. P. Planejamento Fatorial em Química Maximizando a Obtenção de Resultados. 01. *Livro* 2015.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FLOYD, R. A. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: An hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, n. 9-10, p. 1346-1355, 1999.

FRIEBOLIN, H. Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. 5th. 2010.

FURIHATA, K. *et al.* Broadband WET: a novel technique for quantitative characterization of minor components in foods. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 52, n. 7, p. 333-338, 2014.

GALENO, D. M. L. *et al.* Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 172, n. 1, p. 311-324, 2014.

GARRIDO, B. C.; CARVALHO, L. J. Nuclear magnetic resonance using electronic referencing: method validation and evaluation of the measurement uncertainties for the quantification of benzoic acid in orange juice. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 53, n. 2, p. 135-141, 2015.

GARZON, G. A. *et al.* Determination of Carotenoids, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Araza (*Eugenia stipitata* McVaugh), an Amazonian Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 18, p. 4709-4717, 2012.

GENOVESE, M. I. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, v. 14, n. 3, p. 207-214, 2008.

GOMEZ-MIGUEZ, M. J. *et al.* Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*, v. 78, n. 1, p. 238-245, 2007.

GONÇALVES, A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant / Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 8, p. 4666-4674, 2010.

GONÇALVES, A. E. S. S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C. Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo. *Dissertação*, 88, 2008

GOODWIN, J. S.; BRODWICK, M. DIET, AGING, AND CANCER. *Clinics in Geriatric Medicine*, v. 11, n. 4, p. 577-8, 1995.

GRATTAPAGLIA, D. *et al.* Progress in Myrtaceae genetics and genomics: Eucalyptus as the pivotal genus. *Tree Genetics & Genomes*, v. 8, n. 3, p. 463-508, 2012.

GUEDES, M. N. S. *et al.* Minerals And Phenolic Compounds Of Cagaita Fruits At Different Maturation Stages (*Eugenia dysenterica*). *Revista Brasileira De Fruticultura*, v. 39, n. 1, p. 9, 2017.

GULCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, v. 86, n. 3, p. 345-391, Mar 2012.

GUMIENNA, M. Bioactive components of pomegranate fruit and their transformation by fermentation processes. *European Food Research and Technology*, v. 242, n. 5, p. 631-640, 2016.

GÖRÖG, S. Identification and Determination of Impurities in Drugs. 1st Edition. [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com): 2000.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, n. 6, p. 481-504, Nov 2000.

HERNANDEZ, M. S. *et al.* Postharvest quality of araza fruit during low temperature storage. *Lwt-Food Science and Technology*, v. 42, n. 4, p. 879-884, May 2009.

HOLZGRABE, U. *et al.* Quantitative NMR spectroscopy - Applications in drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, n. 5, p. 806-812, Aug 2005.

HOLZGRABE, U.; WAWER, I.; DIEHL, B. *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. 01. 2008.

HOULT, D. I. The principle of reciprocity in signal strength calculations - A mathematical guide. *Concepts in Magnetic Resonance*. 12: 15 p. 2000.

HOULT, D. I.; RICHARDS, R. E. The signal to noise ratio of the Magnetic Nuclear Resonance Experiment. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 24, p. 15, 1976 1976.

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

IKUTA, H. *et al.* C-13 NMR-Spectra Of Cyanidin And Chrysanthemine. *Heterocycles*, v. 23, n. 1, p. 121-126, 1985.

INFANTE, J. *et al.* Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. *Plos One*, v. 11, n. 4, p. 13, 2016.

IRANIFAM, M.; AL LAWATI, H. A. J. Monitoring the antioxidant capacity in honey and fruit juices using a microfluidic device with a NaHCO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Co<sup>2+</sup> chemiluminescence reaction. *Food Chemistry*, v. 297, p. 6, 2019.

KANAZAWA, A.; PATIN, A.; GREENE, A. E. Efficient, highly enantioselective synthesis of selina-1,3,7(11)-trien-8-one, a major component of the essential oil of *Eugenia uniflora*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 9, p. 1292-1294, 2000.

KEELER, J. Understanding NMR Spectroscopy 01 ed. 211 p. 978-0470017869, 0470017864, 2002.

KHALEDI, H. *et al.* Antioxidant, Cytotoxic Activities, and Structure-Activity Relationship of Gallic Acid-based Indole Derivatives. *Archiv Der Pharmazie*, v. 344, n. 11, p. 703-709, 2011.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZELL, H. Natural Killer Cells In Mouse .1. Cytotoxic Cells With Specificity For Mouse Moloney Leukemia-Cells - Specificity And Distribution According To Genotype. *European Journal of Immunology*, v. 5, n. 2, p. 112-117, 1975.

KIKUCHI, J.; YAMADA, S. NMR window of molecular complexity showing homeostasis in superorganisms. *Analyst*, v. 142, n. 22, p. 4161-4172, 2017.

KINUPP, V. F. Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil. 01. 2014.

KRUK, J. *et al.* NMR Techniques in Metabolomic Studies: A Quick Overview on Examples of Utilization. *Applied Magnetic Resonance*, v. 48, n. 1, p. 1-21, 2017.

KULICHOVA, J. *et al.* Juices Enriched with Phenolic Extracts from Grapes. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 36, n. 3, p. 261-267, 2018.

LAZARINI, J. G. *et al.* Anti-inflammatory activity and polyphenolic profile of the hydroalcoholic seed extract of *Eugenia leitonii*, an unexplored Brazilian native fruit. *Journal of Functional Foods*, v. 26, p. 249-257, 2016.

LEMOS, W. J. F. *et al.* Potential use of *Starmerella bacillaris* as fermentation starter for the production of low-alcohol beverages obtained from unripe grapes. *International Journal of Food Microbiology*, v. 303, p. 1-8, 2019.

LIMA, V. L. A. G. D. Fenólicos E Carotenóides Totais Em Pitanga. Daisyvângela E. da Silva Lima. MÊLO, E. D. A. *SciELO: Scientia Agricola*. 59: 4 p. 2002.

LIU, R. H.; FINLEY, J. Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 10, p. 4311-4314, 2005.

MAGALHAES, L. M. *et al.* Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MAGINA, M. D. A. *et al.* Bioactive Triterpenes And Phenolics Of Leaves Of *Eugenia brasiliensis*. *Quimica Nova*, v. 35, n. 6, p. 1184-1188, 2012.

MAGNA, M. D. A., *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. *Journal of Natural Medicines*, v. 63, n. 3, p. 345-350, 2009.

MARCO, G. J. A Rapid Method For Evaluation Of Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 45, n. 9, p. 594-&, 1968.

MARIN, R. *et al.* Volatile components and antioxidant activity from some myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, n. 2, p. 172-177, 2008.

MARKOVIC, A. K. *et al.* Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, v. 24, n. 10, p. 39, 2019.

MARSHALL, D. D.; POWERS, R. Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for metabolomics. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 100, p. 1-16, 2017.

MARTIN, S. *et al.* Neuroprotective properties of Spanish red wine and its isolated polyphenols on astrocytes. *Food Chemistry*, v. 128, n. 1, p. 40-48, 2011.

MAYENGBAM, S. *et al.* Metabolic consequences of discretionary fortified beverage consumption containing excessive vitamin B levels in adolescents. *Plos One*, v. 14, n. 1, p. 14, 2019.

MEILLON, S. *et al.* Acceptability of partially dealcoholized wines - Measuring the impact of sensory and information cues on overall liking in real-life settings. *Food Quality and Preference*, v. 21, n. 7, p. 763-773, 2010.

MICHEL, N.; AKOKA, S. The application of the ERETIC method to 2D-NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 168, n. 1, p. 118-123, 2004.

MILLER, H. E. A Simplified Method for the Evaluation of Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, p. 01, Received June 17, 1970 1970.

MINIM, V. P. R. Análise Sensorial Estudos com Consumidores. 4<sup>a</sup>. 2018.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Original Article, Songklanakarin J. *Sci. Technol.*, v. 26, p. 8, 2004.

MONAKHOVA, Y. B. *et al.* Investigation into the structural composition of hydroalcoholic solutions as basis for the development of multiple suppression pulse sequences for NMR measurement of alcoholic beverages. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 52, n. 12, p. 755-759, 2014.

MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. Dynamic of organic matter and microbial biomass in a soil under different management systems in the Western Amazon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 11, p. 1103-1110, 2004.

MOURA, R. C. D. Desenvolvimento tecnológico de bebida alcoólica fermentada a partir do Araçá-Boi (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Amazonas, <http://tede.ufam.edu.br>. *Dissertação*, 2011.

NAKAYAMA, G. R. *et al.* Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.

NARENDERAN, S. T.; MEYYANATHAN, S. N.; KARRI, V. Experimental design in pesticide extraction methods: A review. *Food Chemistry*, v. 289, p. 384-395, 2019.

NERI-NUMA, I. A. *et al.* Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araca-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. *Food Research International*, v. 50, n. 1, p. 70-76, 2013.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. *Livro*. Edição: 4 ed. 2010 2010. 978-8577806522.

NEVES, K. O. G. Diferenciação química e determinação das atividades antioxidantes de duas espécies botânicas semelhantes: *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* (Myrtaceae). Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas *Dissertação*, 151, 2017.

NEVES, L. C. *et al.* Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. *Food Chemistry*, v. 174, p. 188-196, 2015.

NICACIO, A. E. *et al.* Antioxidant Activity and Determination of Phenolic Compounds from *Eugenia involucrata* DC. Fruits by UHPLC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, v. 10, n. 8, p. 2718-2728, 2017.

O'BRIEN, P. J.; EDVARDSSON, A. Validation of a Multiparametric, High-Content-Screening Assay for Predictive / Investigative Cytotoxicity: Evidence from Technology Transfer Studies and Literature Review. *Chemical Research in Toxicology*, v. 30, n. 3, p. 804-829, 2017.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*. 32: 14 p. 2009.

OLIVEIRA, C. R. Emprego da RMN aliada à quimiometria no controle de qualidade de suco de laranja. Química, Universidade Federal de São Carlos, *Dissertação*, 103, 2012.

OLIVEIRA, E. R. Desenvolvimento de bebida alcoólica fermentada à base de jambolão e caldo de cana-de-açúcar. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, *Dissertação*, 2015.

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*, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, Aug 2011.

PAVUN, L. *et al.* Determination of Flavonoids and Total Polyphenol Contents in Commercial Apple Juices. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 36, n. 3, p. 233-238, 2018.

PARADISO, V. M. *et al.* An easy and green tool for olive oils labelling according to the contents of hydroxytyrosol and tyrosol derivatives: Extraction with a natural deep eutectic solvent and direct spectrophotometric analysis. *Food Chemistry*, v. 291, p. 1-6, Sep 2019.

PEREIRA, G. V. D. *et al.* A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry. *Food Reviews International*, p. 33, 2019.

PESSOA, J. D. C. Acai Handling and Processing Temperatures and Effects on Anthocyanin Concentrations. Xxviii International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (Ihc2010): *International Symposium on Postharvest Technology in the Global Market*, v. 934, p. 69-75, 2012.

PINEIRO, Z. *et al.* Direct Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Quantification of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 21, p. 11683-11689, Nov 2011.

PINTO, J. *et al.* Characterization of chemical compounds susceptible to be extracted from cork by the wine using GC-MS and H-1 NMR metabolomic approaches. *Food Chemistry*, v. 271, p. 639-649, Jan 2019.

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

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

QIU, D. R. *et al.* Antioxidant phenolic compounds isolated from wild *Pyrus ussuriensis Maxim.* fruit peels and leaves. *Food Chemistry*, v. 241, p. 182-187, Feb 2018.

QUIJANO, J. A. P. Volatile compounds of arazá fruit (*Eugenia stipitata* McVaught). *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 38: 06 p. 2007.

QUIROS, M. T. *et al.* Spin Saturation Transfer Difference NMR (SSTD NMR): A New Tool to Obtain Kinetic Parameters of Chemical Exchange Processes. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, n. 117, p. 13, Nov 2016.

RAMOS, A. S. *et al.* Chemical characterization and antioxidant capacity of the araca-pera (*Psidium acutangulum*): An exotic Amazon fruit. *Food Research International*, v. 75, p. 315-327, Sep 2015.

RAMOS, A. S. et al. Pedra-ume caá fruit: An Amazon cherry rich in phenolic compounds with antiglycant and antioxidant properties. *Food Research International*. Elsevier: Elsevier 123: 673-683, 2019..

RIBEIRO, A. B. et al. Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content, Fatty Acids and Correlation by Principal Component Analysis of Exotic and Native Fruits from Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, n. 5, p. 797-804, May 2013.

RIZZON, L. A.; DALL'AGNOL, I. Coleção Agroindústria Familiar - Vinho Branco. Embrapa Informação Tecnológica. *Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa*. 01: 50 p. 2009.

RODRIGUES, A. C. et al. Quorum Quenching and Microbial Control through Phenolic Extract of *Eugenia Uniflora* Fruits. *Journal of Food Science*, v. 81, n. 10, p. M2538-M2544, Oct 2016.

ROGEZ, H. et al. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araca-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuacu (*Theobroma grandiflorum*). *European Food Research and Technology*, v. 218, n. 4, p. 380-384, Mar 2004.

ROMAGNOLO; MARIZA; BARION. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 20: 19 p. 2006.

RUFINO, M. D. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, v. 121, n. 4, p. 996-1002, Aug 2010.

SAMSON, A. K. S. Optimum Parameters For Wine Production From Pomegranate Fruit Juice. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*. 08: 05 p. 2017.

SANTANA, M. J. O uso da ressonância magnética nuclear na análise do perfil químico de sucos de uva do tipo integral e néctar. Química, Universidade Federal de Goiania, Tese, 169, 2017.

SANTOS, M. S. Validação de método quantitativo por RMN de <sup>1</sup>H para análises de formulações farmacêuticas. *Química Nova*. 36: 07 p. 2013.

SARDI, J. D. O. *et al.* Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. *Microbial Pathogenesis*, v. 105, p. 280-287, Apr 2017.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, v. 14, p. 111-125, Apr 2015.

SILVA, K.; SIRASA, M. S. F. Antioxidant properties of selected fruit cultivars grown in Sri Lanka. *Food Chemistry*, v. 238, p. 203-208, Jan 2018.

SIMMLER, C. *et al.* Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 25, p. 51-59, Feb 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants*, Pt A, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOBRAL, M. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Reflora. Flora do Brasil 2015.

SOUSA, S. A. A.; MAGALHAES, A.; FERREIRA, M. M. C. Optimized bucketing for NMR spectra: Three case studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 122, p. 93-102, Mar 2013.

SOUZA, A. C. Utilização de cagaita, jabuticaba e pitaya na elaboração de fermentado alcoólico e vinagre. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, 140, Tese, 2015.

SOUZA, L. A. Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação. 2009.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. *Chemistry & Biodiversity*, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

STONE, H.; SIDEL, J. Sensory Evaluation Practices. 03. 2004.

TANGPAISARNKUL, N. *et al.* Development of pure certified reference material of stevioside. *Food Chemistry*, v. 255, p. 75-80, Jul 2018.

THIRUNAVUKKARASU, M. *et al.* White wine induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury is mediated by life extending Akt/FOXO3a/NF kappa

B survival pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 15, p. 6733-6739, Aug 2008.

TIBALLI, R. N. *et al.* Use Of A Colorimetric System For Yeast Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 4, p. 915-917, Apr 1995.

TOMITA, S.; NAKAMURA, T.; OKADA, S. NMR- and GC/MS-based metabolomic characterization of sunki, an unsalted fermented pickle of turnip leaves. *Food Chemistry*, v. 258, p. 25-34, Aug 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10. 2012.

TOURNAIRE, C. *et al.* Antioxidant Activity Of Flavonoids - Efficiency Of Singlet Oxygen (1(Delta)G) Quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 19, n. 3, p. 205-215, Aug 1993.

TYBURN, J. M.; COUTANT, J. TopSpin ERETIC2: Electronic to Access In-Vivo Concentration - User Manual 01. 2016.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

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

VIANA, E. D. *et al.* Physicochemical And Sensorial Characterization Of Papaya And Araca Boi Jelly. *Revista Brasileira De Fruticultura*, v. 34, n. 4, p. 1154-1164, Dec 2012.

VINHOLES, J. *et al.* In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araca, butia and pitanga. *Food Bioscience*, v. 19, p. 92-100, Sep 2017.

VIRAPONGSE, A. *et al.* Ecology, livelihoods, and management of the *Mauritia flexuosa* palm in South America. *Global Ecology and Conservation*, v. 10, p. 70-92, Apr 2017.

VIRGOLIN, L. B.; SEIXAS, F. R. F.; JANZANTTI, N. S. Composition, content of bioactive compounds, and antioxidant activity of fruit pulps from the Brazilian

Amazon biome. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 52, n. 10, p. 933-941, Oct 2017.

WALKER, G. S. *et al.* Validation of Isolated Metabolites from Drug Metabolism Studies as Analytical Standards by Quantitative NMR. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 39, n. 3, p. 433-440, Mar 2011.

WIDER, G.; DREIER, L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 8, p. 2571-2576, Mar 2006.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 22, p. 8896-8907, Oct 2007.

WOOD, B. J. B. Industrial Evolution Of Fermented Foods. *Food Biotechnology*, v. 5, n. 3, p. 279-291, 1991.

Wu, C.; Xu, G. J.; Pan, W.; Alzheimers Dis Neuroimaging, I. An Adaptive Test On High-Dimensional Parameters In Generalized Linear Models. *Statistica Sinica*, 29, N. 4, P. 2163-2186, Oct 2019.

YOU DIM, K. A.; JOSEPH, J. A. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: A multiplicity of effects. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 30, n. 6, p. 583-594, Mar 2001.

ZURIARRAIN, A. *et al.* Polyphenolic profile in cider and antioxidant power. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, n. 14, p. 2931-2943, Nov 2015.

# 1. APÊNDICES

## Apêndice I

1

### Amostra

Indique o quanto você gostou do AROMA:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Indique o quanto você gostou do SABOR:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Por favor, descreva o que em particular você gostou ou desgostou

Mais gostei: \_\_\_\_\_

Menos gostei: \_\_\_\_\_

Indique qual seria sua atitude em relação à compra do produto:

Certamente compraria ( )	Provavelmente compraria ( )	Talvez sim, talvez não compraria ( )	Provavelmente não compraria ( )	Certamente não compraria ( )
-----------------------------	--------------------------------	--	---------------------------------------	------------------------------------

2

### Amostra

Indique o quanto você gostou do AROMA:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Indique o quanto você gostou do SABOR:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Por favor, descreva o que em particular você gostou ou desgostou

Mais gostei: \_\_\_\_\_

Menos gostei: \_\_\_\_\_

Indique qual seria sua atitude em relação à compra do produto:

Certamente compraria ( )	Provavelmente compraria ( )	Talvez sim, talvez não compraria ( )	Provavelmente não compraria ( )	Certamente não compraria ( )
-----------------------------	--------------------------------	--	---------------------------------------	------------------------------------

3

### Amostra

Indique o quanto você gostou do AROMA:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Indique o quanto você gostou do SABOR:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Por favor, descreva o que em particular você gostou ou desgostou

Mais gostei: \_\_\_\_\_

Menos gostei: \_\_\_\_\_

Indique qual seria sua atitude em relação à compra do produto:

Certamente compraria ( )	Provavelmente compraria ( )	Talvez sim, talvez não compraria ( )	Provavelmente não compraria ( )	Certamente não compraria ( )
-----------------------------	--------------------------------	--	---------------------------------------	------------------------------------

4

### Amostra

Indique o quanto você gostou do AROMA:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Indique o quanto você gostou do SABOR:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Por favor, descreva o que em particular você gostou ou desgostou

Mais gostei: \_\_\_\_\_

Menos gostei: \_\_\_\_\_

Indique qual seria sua atitude em relação à compra do produto:

Certamente compraria ( )	Provavelmente compraria ( )	Talvez sim, talvez não compraria ( )	Provavelmente não compraria ( )	Certamente não compraria ( )
-----------------------------	--------------------------------	--	---------------------------------------	------------------------------------

5

**Amostra**

Indique o quanto você gostou do AROMA:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Indique o quanto você gostou do SABOR:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Por favor, descreva o que em particular você gostou ou desgostou

Mais gostei: \_\_\_\_\_

Menos gostei: \_\_\_\_\_

Indique qual seria sua atitude em relação à compra do produto:

Certamente compraria ( )	Provavelmente compraria ( )	Talvez sim, talvez não compraria ( )	Provavelmente não compraria ( )	Certamente não compraria ( )
-----------------------------	--------------------------------	--	---------------------------------------	------------------------------------

6

**Amostra**

Indique o quanto você gostou do AROMA:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Indique o quanto você gostou do SABOR:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Por favor, descreva o que em particular você gostou ou desgostou

Mais gostei: \_\_\_\_\_

Menos gostei: \_\_\_\_\_

Indique qual seria sua atitude em relação à compra do produto:

Certamente compraria ( )	Provavelmente compraria ( )	Talvez sim, talvez não compraria ( )	Provavelmente não compraria ( )	Certamente não compraria ( )
-----------------------------	--------------------------------	--	---------------------------------------	------------------------------------

7

**Amostra**

Indique o quanto você gostou do AROMA:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Indique o quanto você gostou do SABOR:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Por favor, descreva o que em particular você gostou ou desgostou

Mais gostei: \_\_\_\_\_

Menos gostei: \_\_\_\_\_

Indique qual seria sua atitude em relação à compra do produto:

Certamente compraria ( )	Provavelmente compraria ( )	Talvez sim, talvez não compraria ( )	Provavelmente não compraria ( )	Certamente não compraria ( )
-----------------------------	--------------------------------	--	---------------------------------------	------------------------------------

8

**Amostra**

Indique o quanto você gostou do AROMA:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Indique o quanto você gostou do SABOR:

Gostei extremamente ( )	Gostei muito ( )	Gostei ( )	Gostei Pouco ( )	Não gostei nem desgostei ( )	Desgostei pouco ( )	Desgostei ( )	Desgostei muito ( )	Desgostei extremamente ( )
-------------------------------	------------------------	---------------	------------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------	----------------------------------

Por favor, descreva o que em particular você gostou ou desgostou

Mais gostei: \_\_\_\_\_

Menos gostei: \_\_\_\_\_

Indique qual seria sua atitude em relação à compra do produto:

Certamente compraria ( )	Provavelmente compraria ( )	Talvez sim, talvez não compraria ( )	Provavelmente não compraria ( )	Certamente não compraria ( )
-----------------------------	--------------------------------	--	---------------------------------------	------------------------------------

## Apêndice II

### Protocolo de calibração do experimento ERETIC2

#### A. OBJETIVO:

Fornecer instruções adequadas à correta execução da calibração eletrônica (**ERETIC2**) para RMNq de  $^1\text{H}$ , para amostras de líquido.

#### B. ALCANCE:

Todos os estagiários, bolsistas e funcionários do laboratório.

#### C. RESPONSABILIDADE:

Todos os usuários.

#### D. EQUIPAMENTO UTILIZADO:

##### D1. Aparelho:

Bruker Avance III 500 (campo de 11,75 Tesla: 500,13 MHz na frequência do hidrogênio e 125,76 MHz para o carbono).

##### D2. Sonda:

BBFO (*Multinuclear Broadband Fluorine Observe*) Plus SmartProbe™.

## E. CONCEITO / FINALIDADE:

Experimento realizado para a detecção do núcleo de hidrogênio visando à calibração eletrônica (ERETIC) para obtenção de medidas quantitativas por meio do dispositivo eletrônico (ERETIC2).

## F. PROCEDIMENTO:

### E1. Sequência de Pulso:

ZG 90, ZG 30, NOESYGPPR1D e LC1PNGPPS (Sequências de pulsos com nomenclatura Bruker).

## G. PROCEDIMENTO OPERACIONAL:

Nesse protocolo foi adotado o padrão primário quinina, na concentração de 10,0 mmol.L<sup>-1</sup>.

Na aba BSMS, ativar o **Lift N** (ou digitar ej na barra de comandos para ejetar a amostra);

Inserir amostra e desativar o **Lift** (ou digitar ij na barra de comandos para injetar a amostra);

Aguardar cerca de 5 minutos para ambientação da amostra;

Criar um novo experimento (ou **Ctrl + N**): abrir um experimento com a sequência de pulso ZG e digitar o comando **edc**, a partir da pasta Modelos;

Para carregar o *shimming*: digitar o comando **rsh** e localizar o *shimming* padrão para aquele solvente e sonda;

Para sintonia: digitar wobb (ou wobb <sup>1</sup>H – para H);

Não girar a amostra;

Para travar o campo: digitar o comando **lock** + o nome do solvente (ou apenas lock);

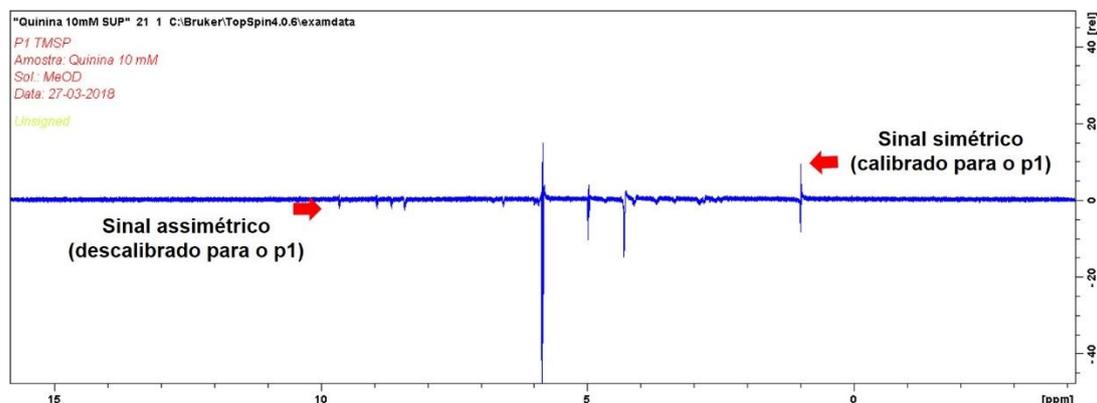
Ajustar a fase do lock;

No início dos experimentos diários, executar **topshim 3d** com amostra padrão (90% H<sub>2</sub>O / 10% D<sub>2</sub>O). Salvar o shimming como **topshim3d**, seguido do nome do operador que o executou;

Executar topshim;

Para ajuste fino do *shimming*, otimizar os eixos Z, Z2, X, XZ, Y, YZ até obter a maior altura na linha do lock de modo que a mesma se mantenha estável (esse procedimento é feito apenas no começo de uma análise diária);

Ajustar a sequência de pulso para ZG (ZG90), e ajustar: Spin (off), Tune (atma exact), shimming (topshimming), não dar get prosol, calcular o rg, e calcular o p1 por meio do comando **pulsecal** (pulsecal para solventes inorgânicos e pulsecal sn para solventes orgânicos). O software fornecerá um valor de p1 (ex.: p1: 10 µs). Deve-se então adquirir um espectro com o novo valor de p1x4 (ns: 1 e ds: 1) com os comandos “zg; fp” (aquisição seguida da transformada de Fourier + correção de fase 1D). O sinal referente a molécula de interesse deve ser cuidadosamente ajustado para se tornar simétrico (nulo). Para ajustar o sinal para a fase positiva, p1>10. Para ajustar o sinal para a fase negativa, p1<10.



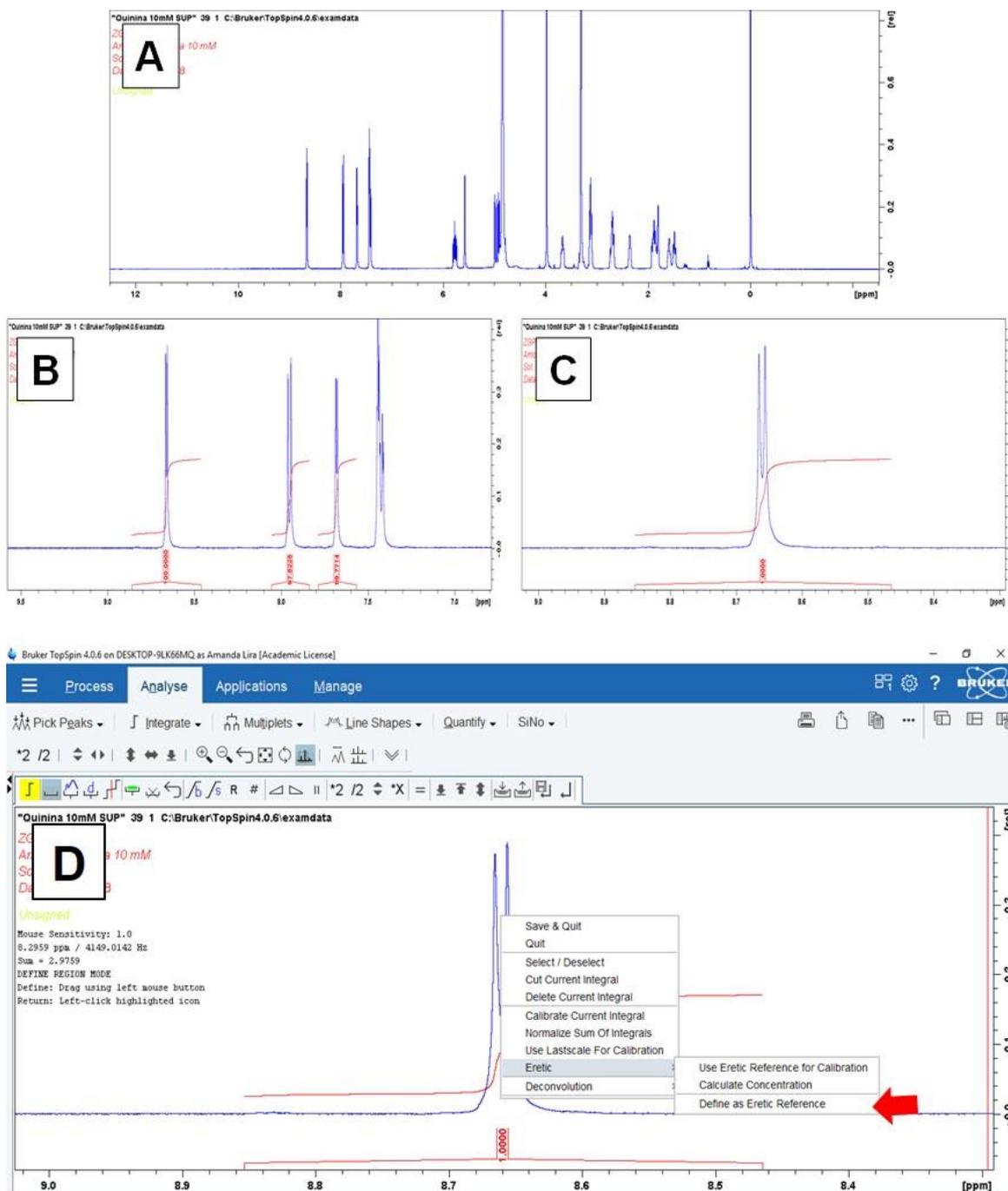
Após calibrar o p1, deve-se ajustar a sequência de pulsos para **t1ir1d**. Os parâmetros devem ser ajustados da mesma forma que o experimento de p1, excessão ao valor de **d7** (d7: 0) que deve ser ajustado de modo a se anular o

sinal da substância de interesse, até que o mesmo fique simétrico. Para ajustar o sinal para a fase positiva,  $d7 > 0$ . Para ajustar o sinal para a fase negativa,  $d7 < 0$ .

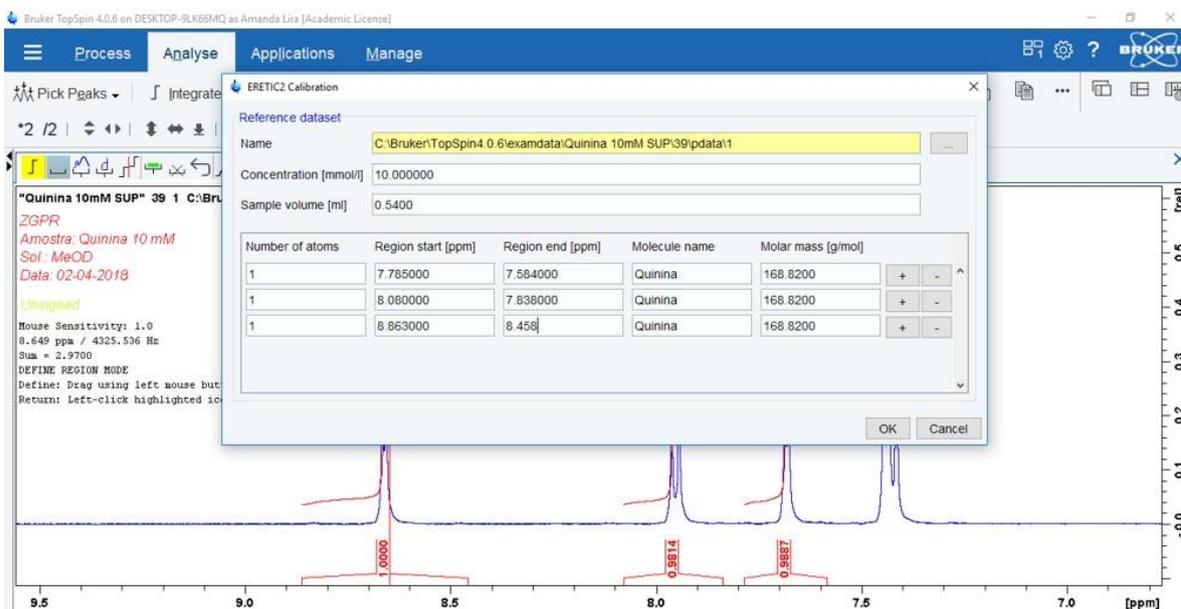
Após ajustar o sinal de interesse, deve-se dividi-lo por  $\ln 2$  ( $d7/\ln 2$ ). O valor obtido é referente ao tempo de relaxação longitudinal, ou  $T_1$ . Considerando-se que  $d1 = 5 \times T_1$  ou  $7 \times T_1$ , um novo experimento pode então ser adquirido. Ao término da calibração de  $p1$  e  $T_1$ , obter um espectro em condições quantitativas, com **NS** suficiente para que a relação sinal-ruído seja  $\geq 100$ . Os parâmetros experimentais devem ser **padronizados** para cada réplica do padrão e os espectros devem ser adquiridos de modo **automático** e não manual. Ex.: o ajuste de sintonia da sonda deve ser executado com o comando “atma exact”;

Após a aquisição, integrar todos os sinais livres referentes à uma amostra de padrão primário (a integral deve englobar também, se possível, os sinais de acoplamento com  $^{13}\text{C}$ ), contendo uma referência interna com uma concentração conhecida;

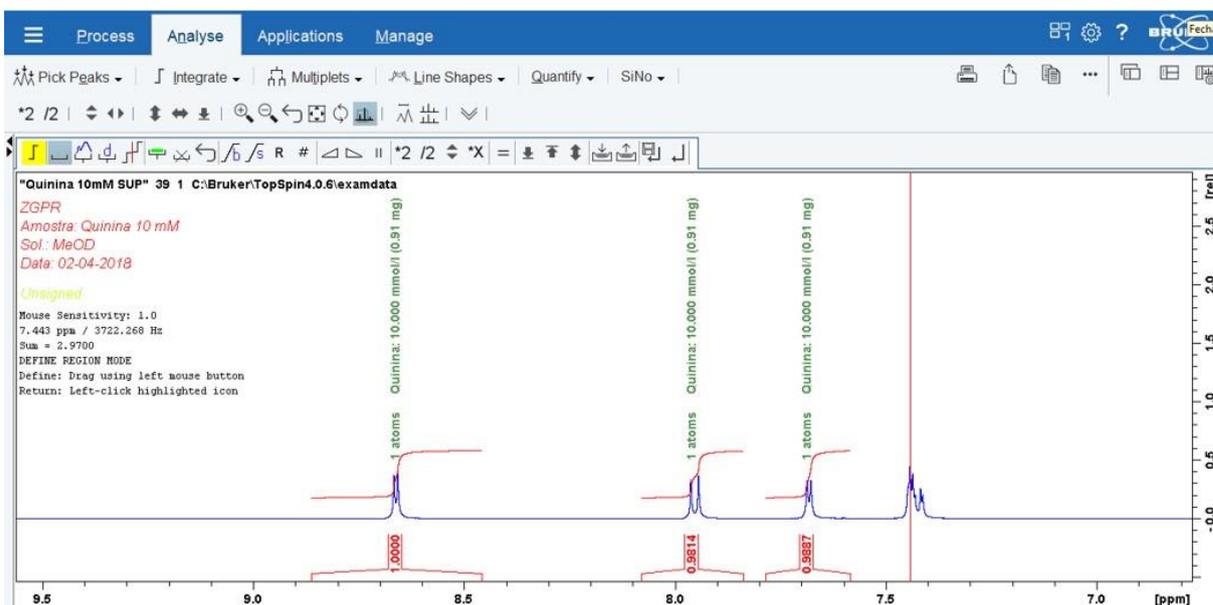
Selecionar todos os sinais integrados, clicar com o botão direito nas opções mostradas na figura abaixo.



Em seguida deve-se inserir o valor da concentração da amostra padrão (considerando a pureza da mesma) e os valores referentes ao número de núcleos que dão origem a cada sinal seleccionado, como na figura abaixo.



Ao clicar em **OK** a calibração estará completa como na figura abaixo.



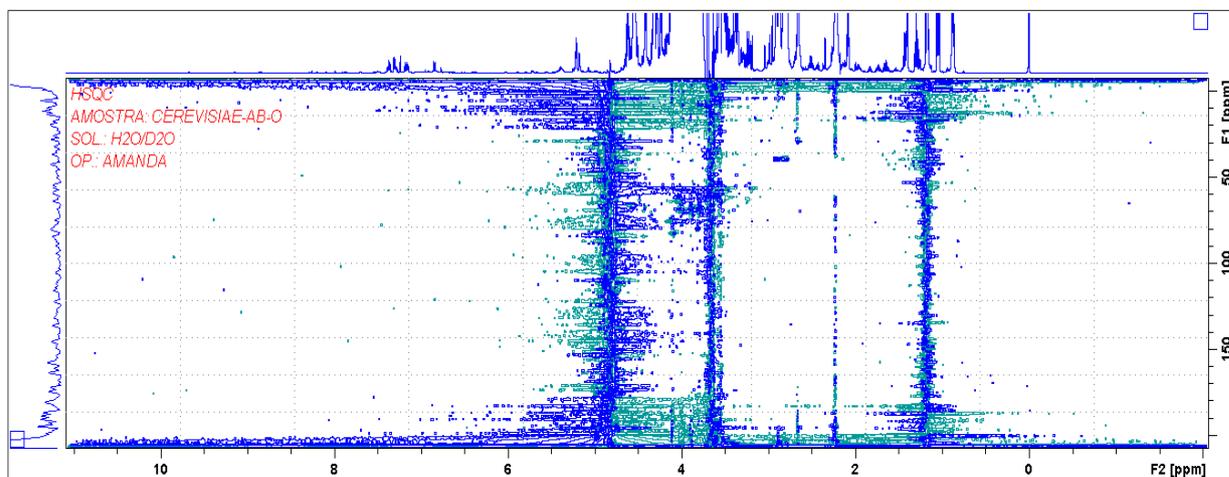
Ao término da calibração é recomendado testar utilizando réplicas de padrões primários.

## H. Referência

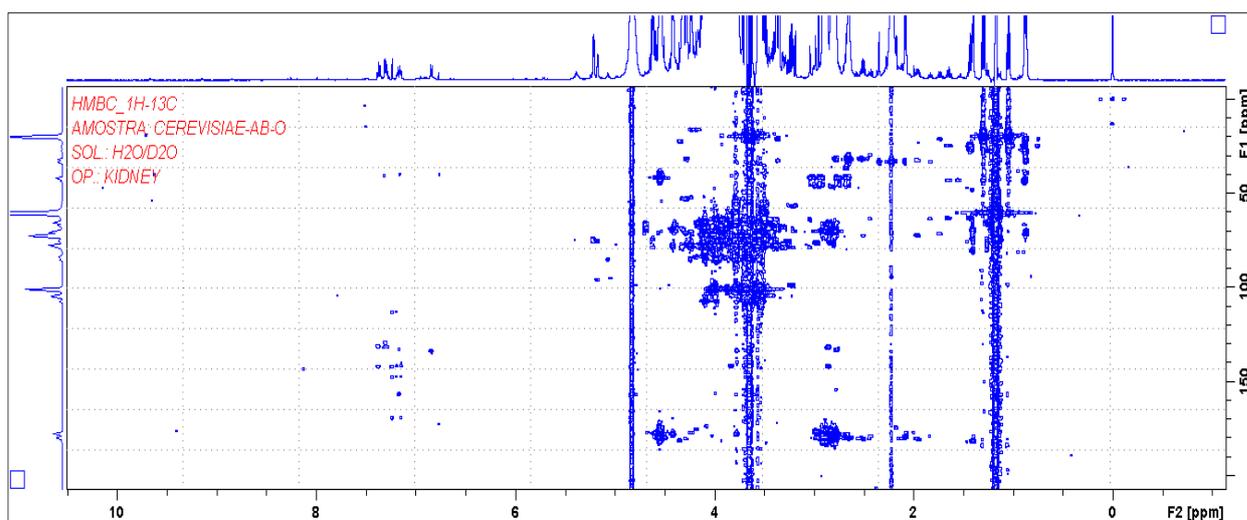
Manual do usuário ERETIC2 – Bruker Biospin, 2016.

## Apêndice III

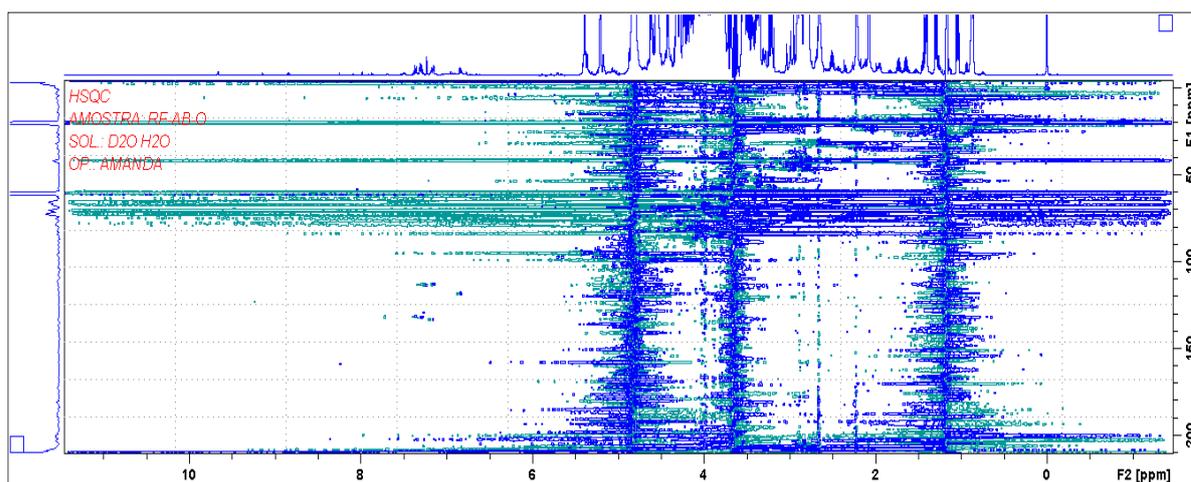
## Espectros de RMN



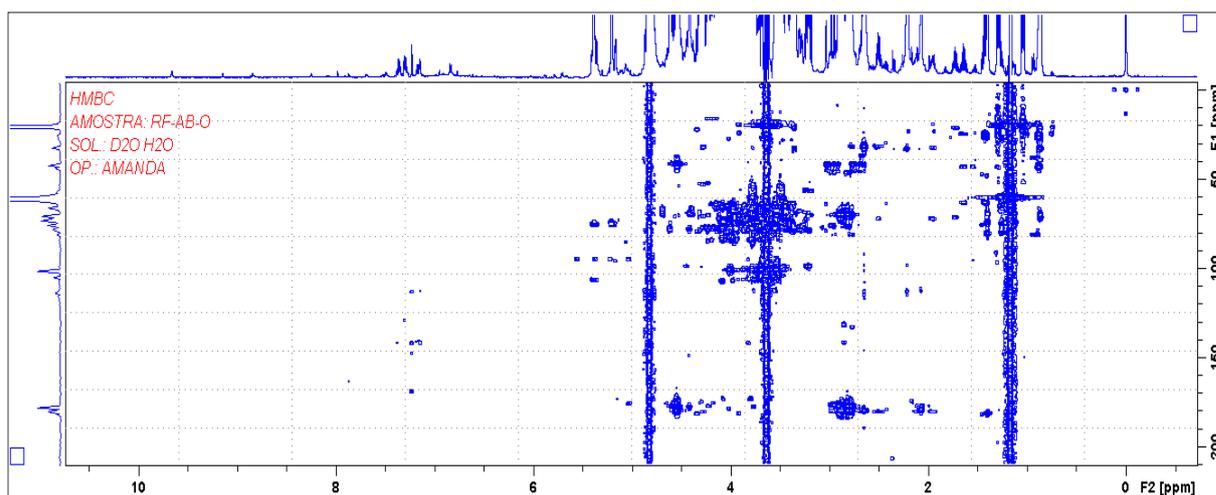
**Figura S 1.** Mapa de correlação HSQC de <sup>13</sup>C da amostra da bebida BCE-I (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, TMSP).



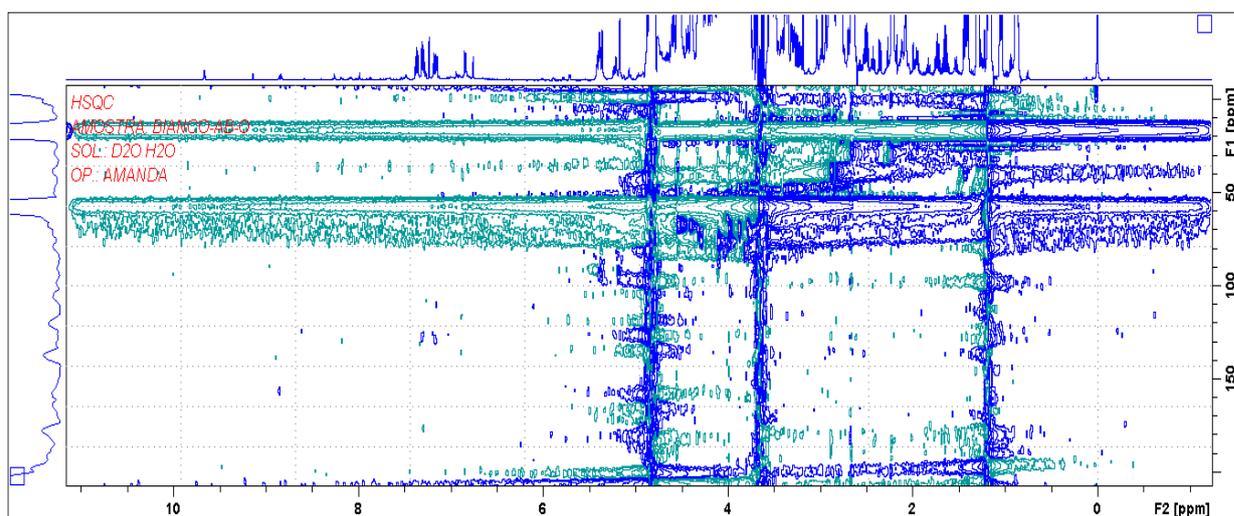
**Figura S 2.** Mapa de correlação HMBC de <sup>13</sup>C da amostra da bebida BCE-I (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, TMSP).



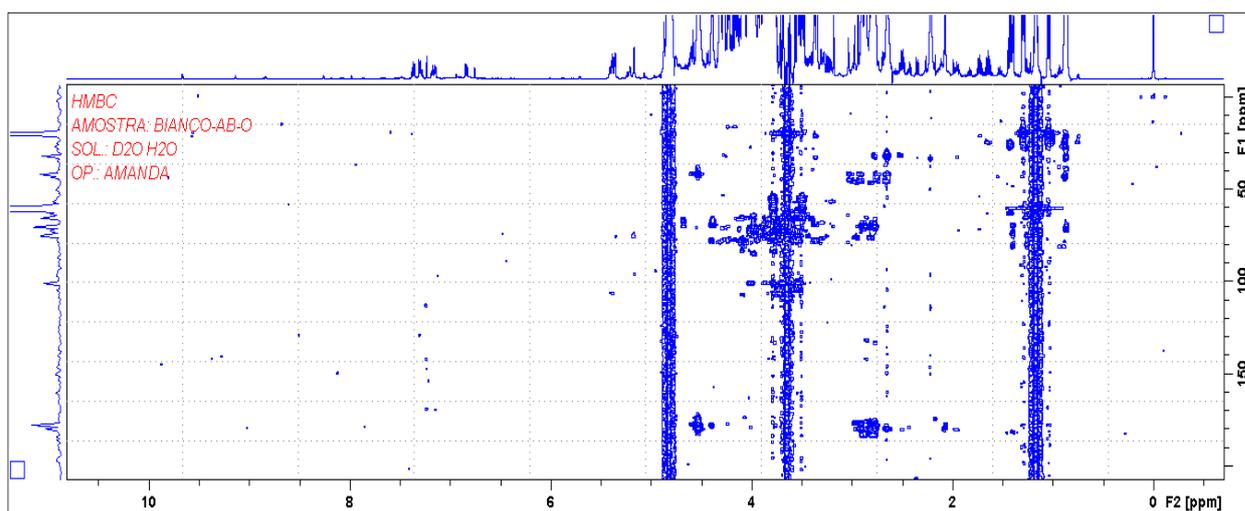
**Figura S 3.** Mapa de correlação HSQC de <sup>13</sup>C da amostra da bebida BRO-I (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, TMSP).



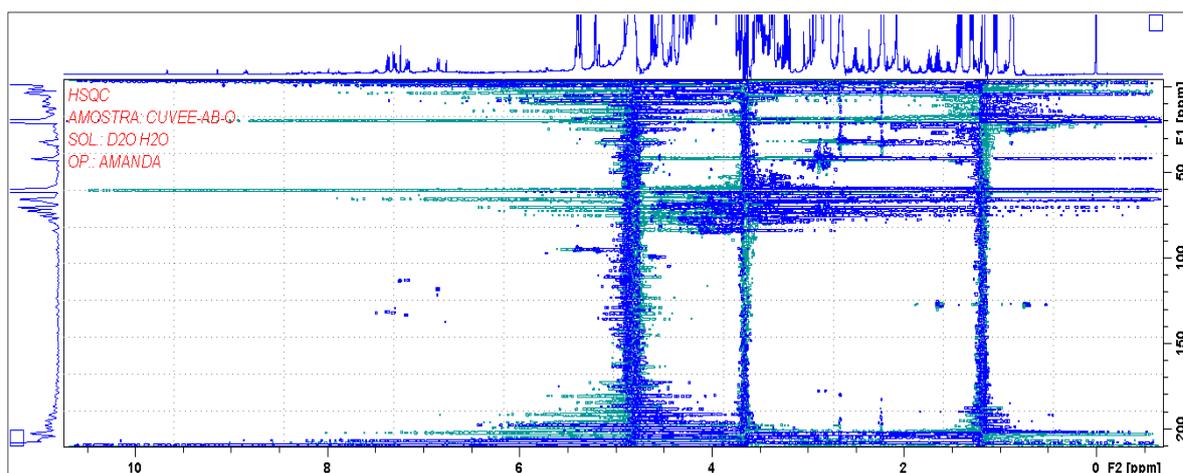
**Figura S 4.** Mapa de correlação HMBC de <sup>13</sup>C da amostra da bebida BRO-I (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, TMSP).



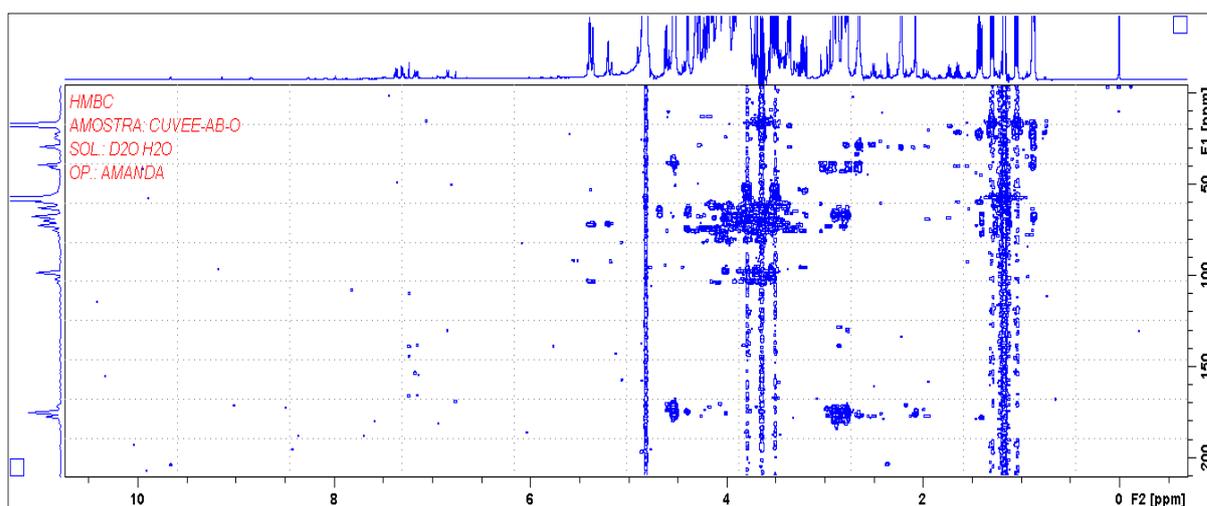
**Figura S 5.** Mapa de correlação HSQC de <sup>13</sup>C da amostra da bebida BBI-I-F (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, TMSP).



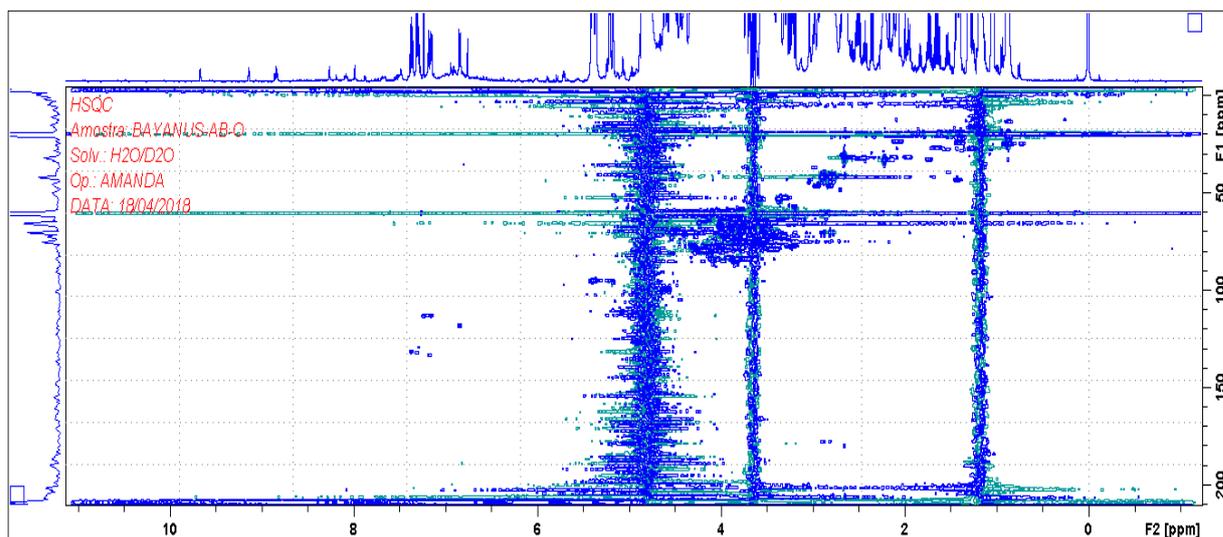
**Figura S 6.** Mapa de correlação HMBC de <sup>13</sup>C da amostra da bebida BBI-I-F (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, TMSP).



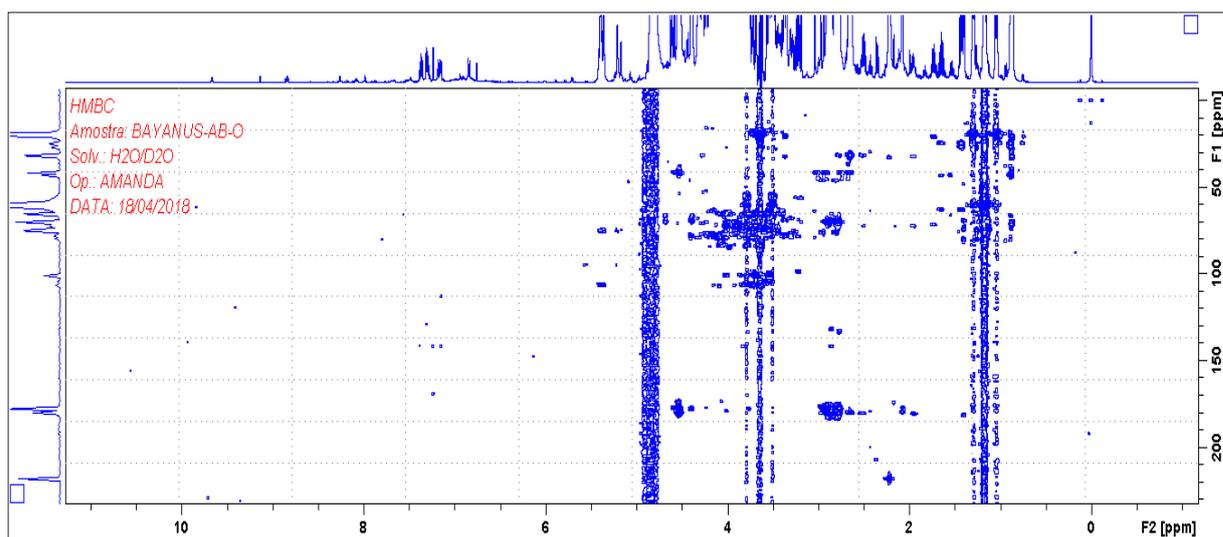
**Figura S 7.** Mapa de correlação HSQC de  $^{13}\text{C}$  da amostra da bebida ACU-I (11,7 T,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ , TMSP).



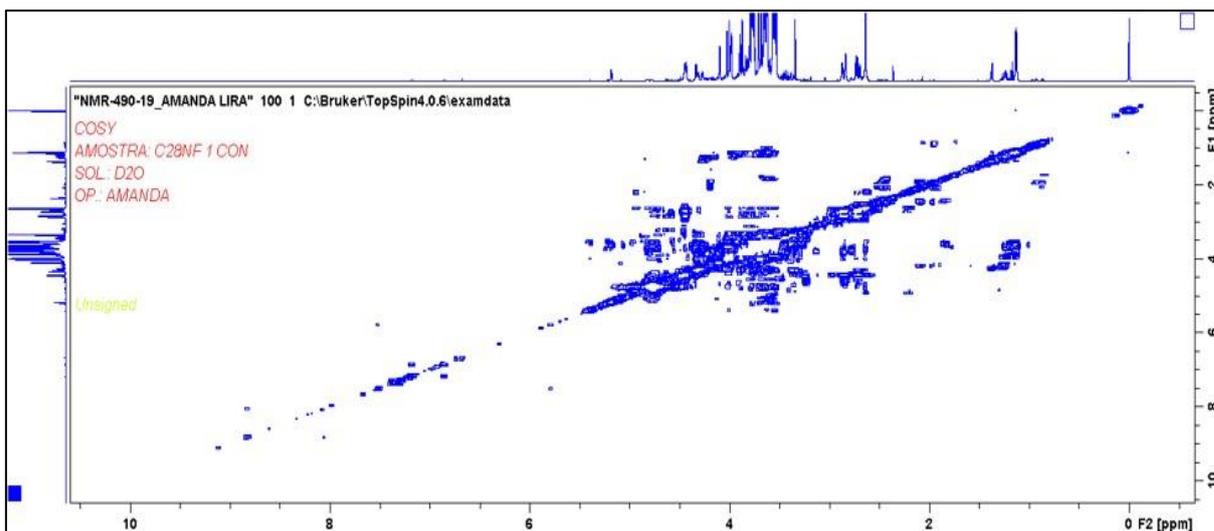
**Figura S 8.** Mapa de correlação HMBC de  $^{13}\text{C}$  da amostra da bebida ACU-I (11,7 T,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ , TMSP).



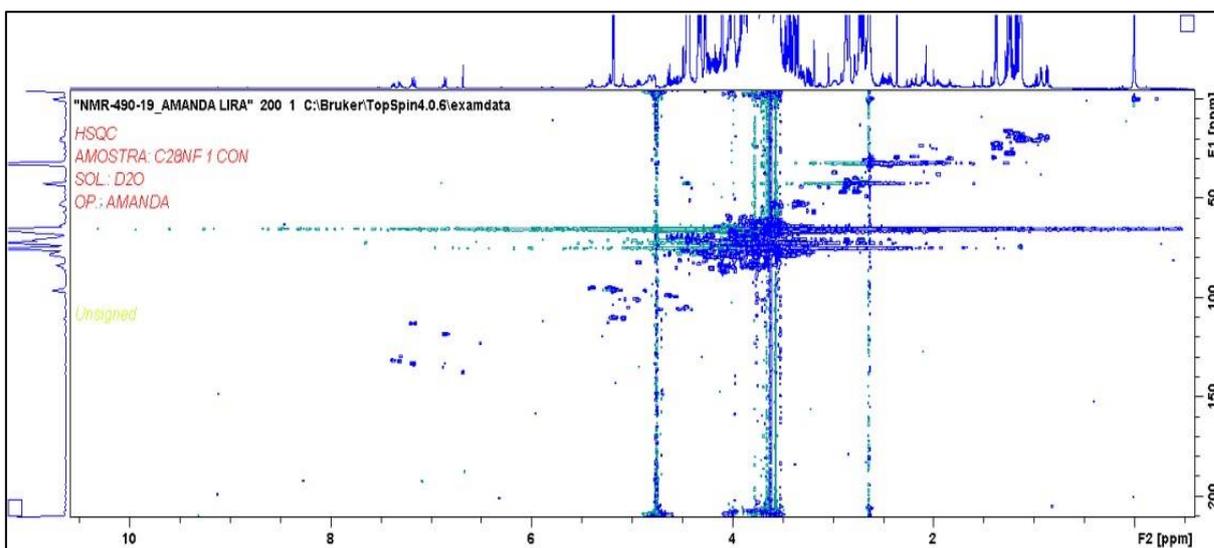
**Figura S 9.** Mapa de correlação HSQC de <sup>13</sup>C da amostra da bebida BBA-I (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, TMSP).



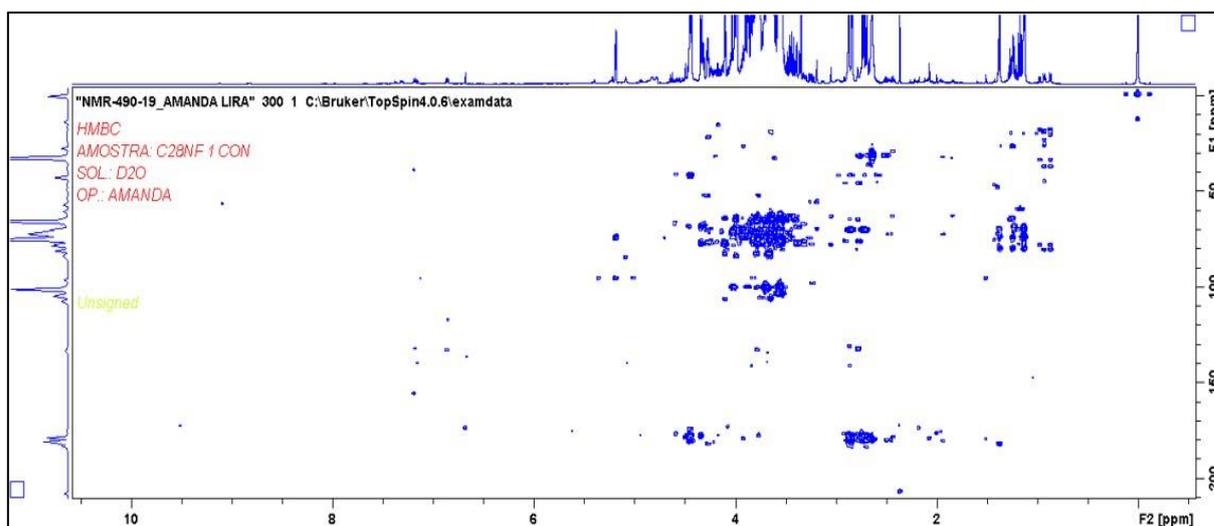
**Figura S 10.** Mapa de correlação HMBC de <sup>13</sup>C da amostra da bebida BBA-I (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, TMSP).



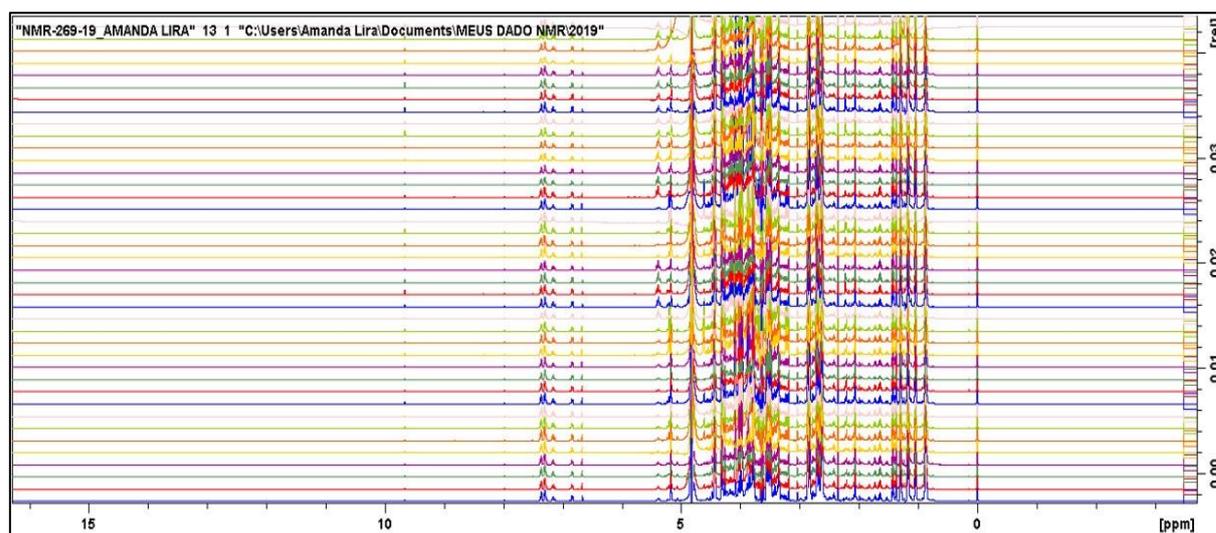
**Figura S 11.** Mapa de correlação COSY de  $^{13}\text{C}$  da amostra da bebida C28NF (11,7 T,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ , TMSP).



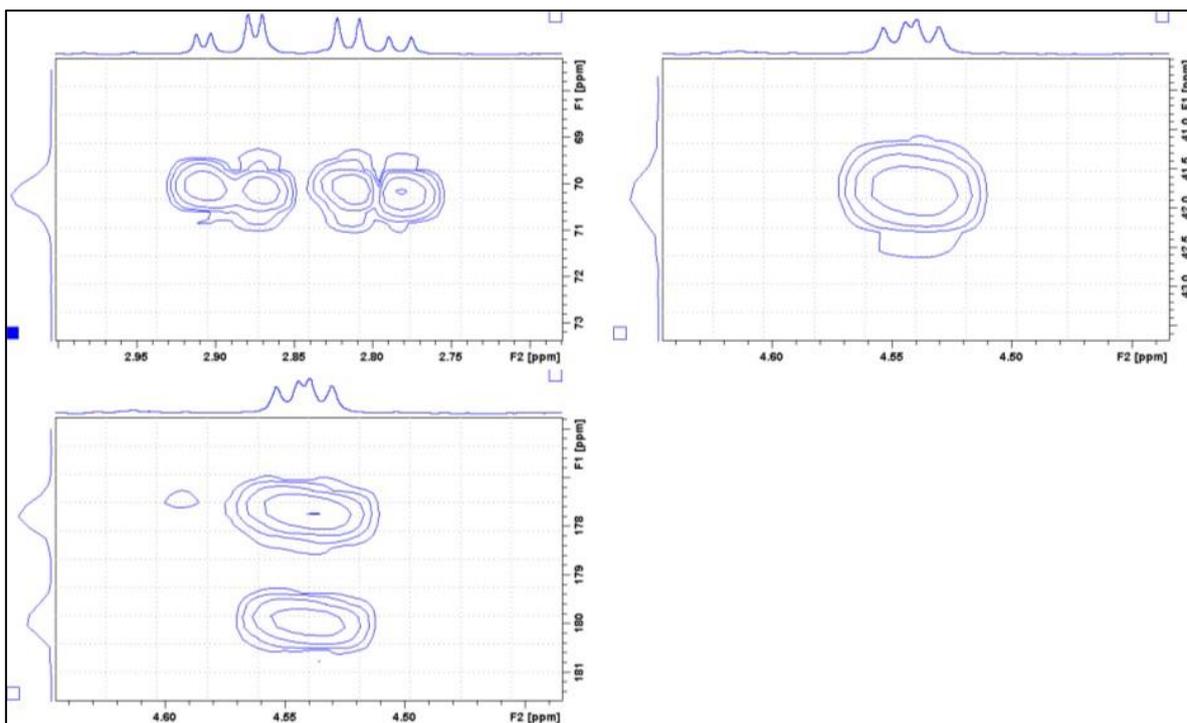
**Figura S 12.** Mapa de correlação HSQC de  $^{13}\text{C}$  da amostra da bebida C28NF (11,7 T,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ , TMSP).



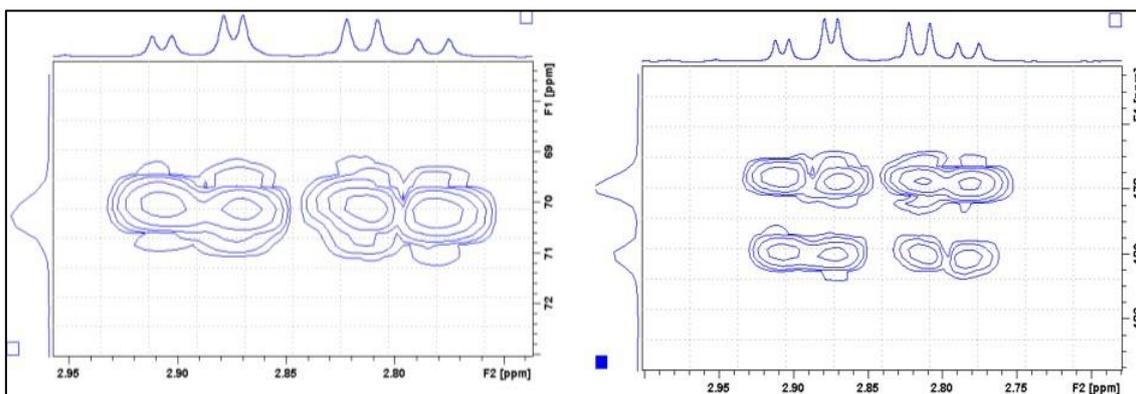
**Figura S 13.** Mapa de correlação HMBC de <sup>13</sup>C da amostra da bebida C28NF (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, TMSP).



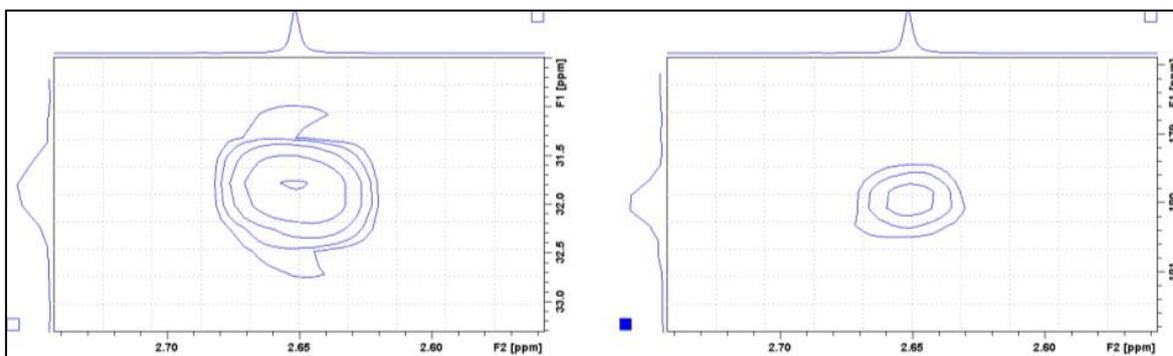
**Figura S 14.** Sobreposição dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H das amostras das quarenta bebidas fermentadas produzidas com o planejamento fatorial completo (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O). Espectro total.



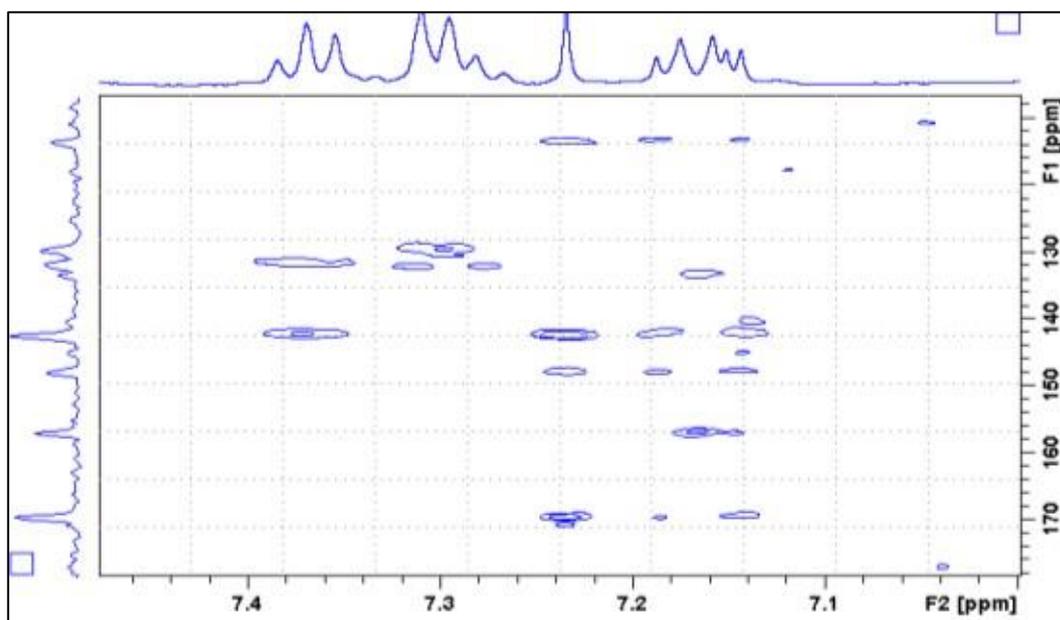
**Figura S 15.** HSQC e HMBC do ácido málico da amostra da bebida C28NF (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O).



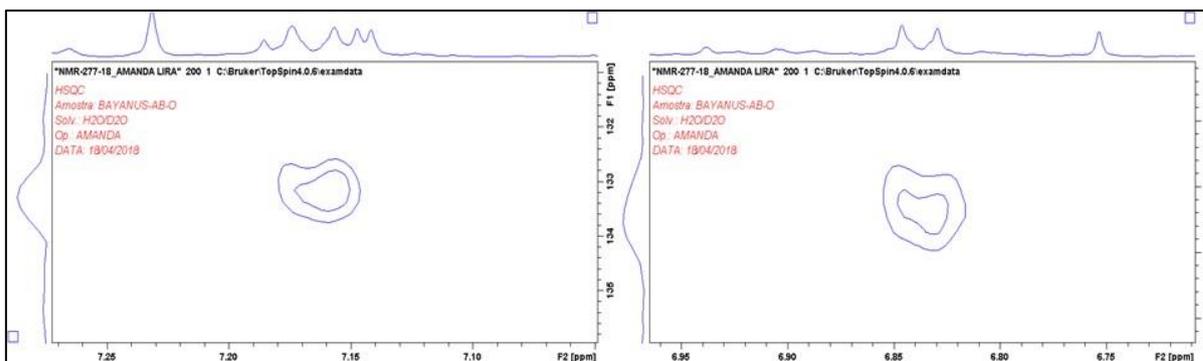
**Figura S 16.** HSQC e HMBC do ácido cítrico da amostra da bebida C28NF (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O).



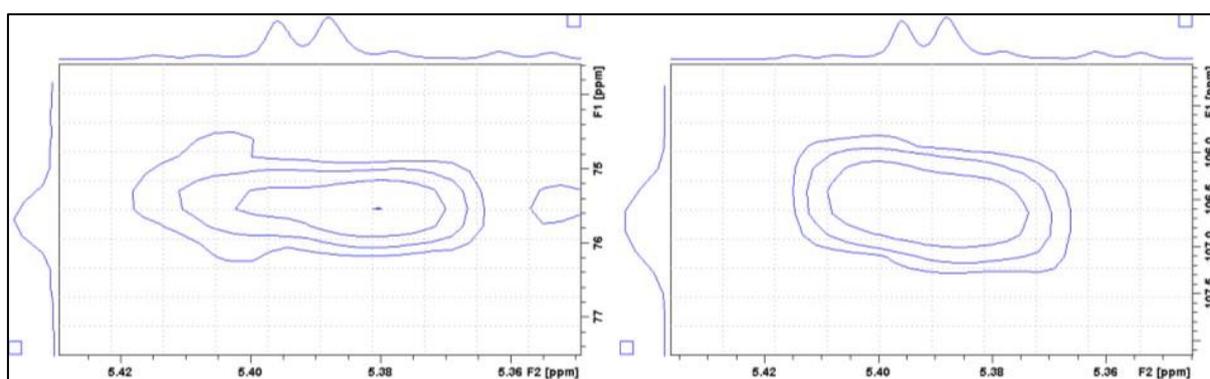
**Figura S 17.** HSQC e HMBC do ácido succínico da amostra da bebida C28NF (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O).



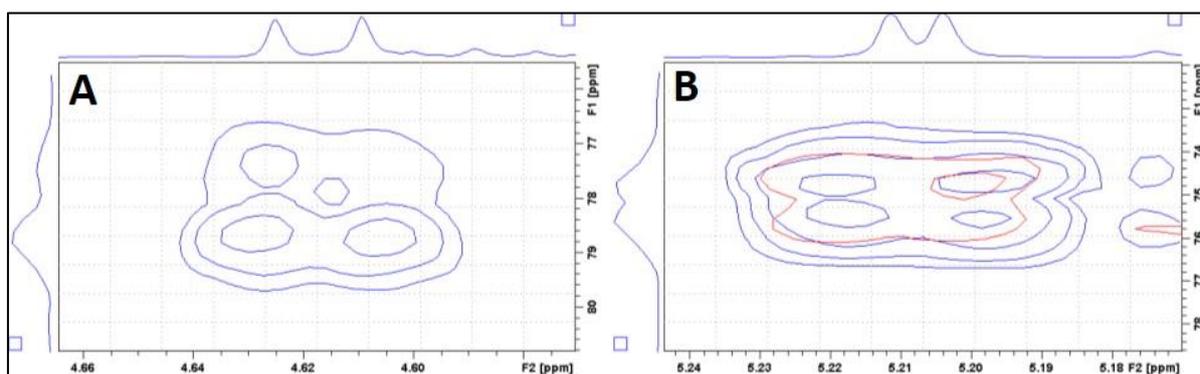
**Figura S 18.** HMBC do ácido gálico da amostra da bebida BCE-I (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O).



**Figura S 19.** HSQC e HMBC do tirosol da amostra da bebida BCE-I (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O).

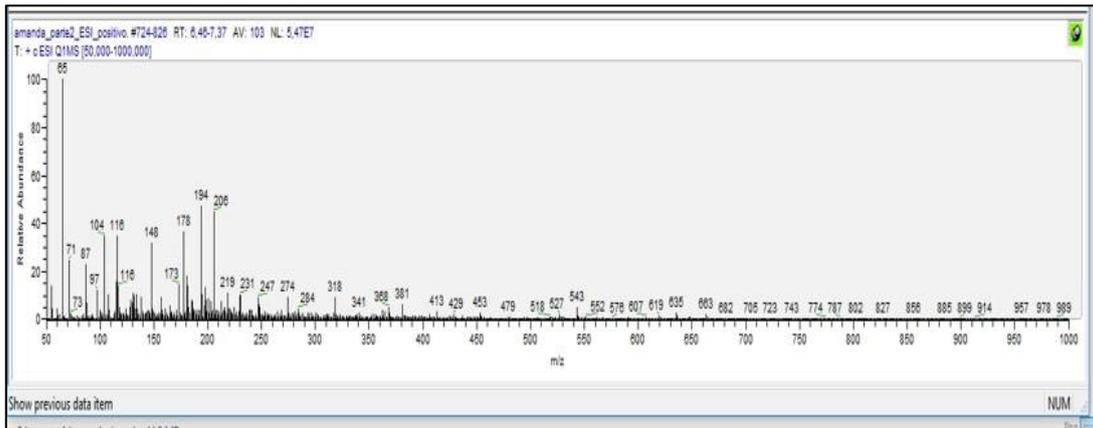


**Figura S 20.** HSQC e HMBC da sacarose da amostra da bebida BCE-I (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O).

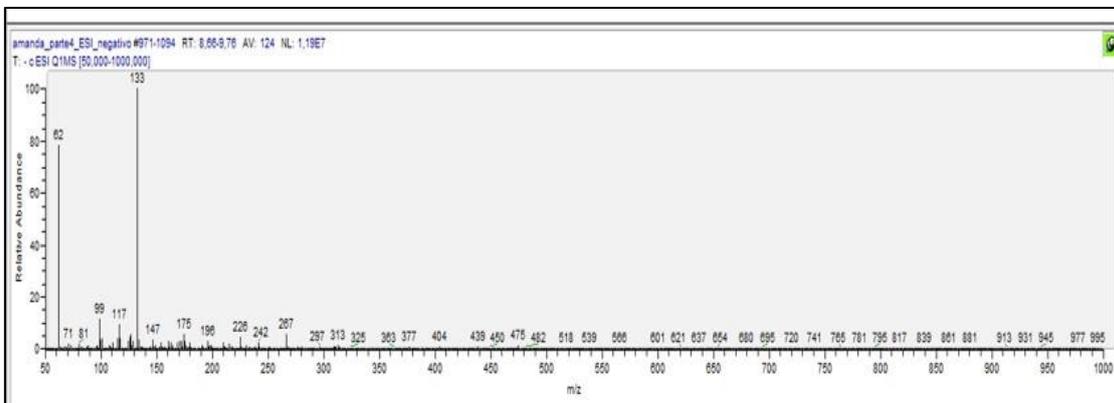


**Figura S 21.** HSQC da glicose (alfa: **A**; beta: **B**) da amostra da bebida BCE-I (11,7 T, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O).

## Espectros de Massas



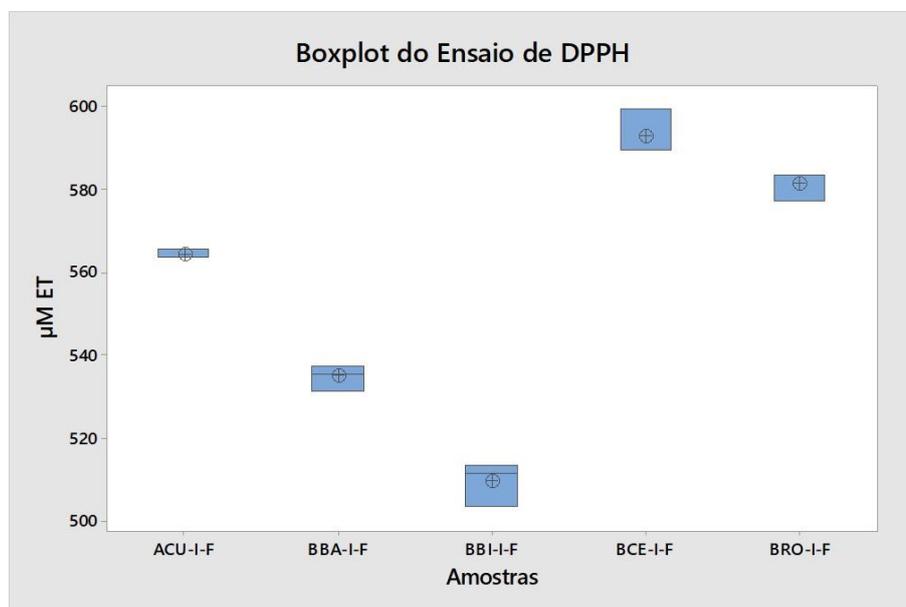
**Figura S 22.** Espectro de massas (modo positivo) representativo da bebida fermentada B18F.



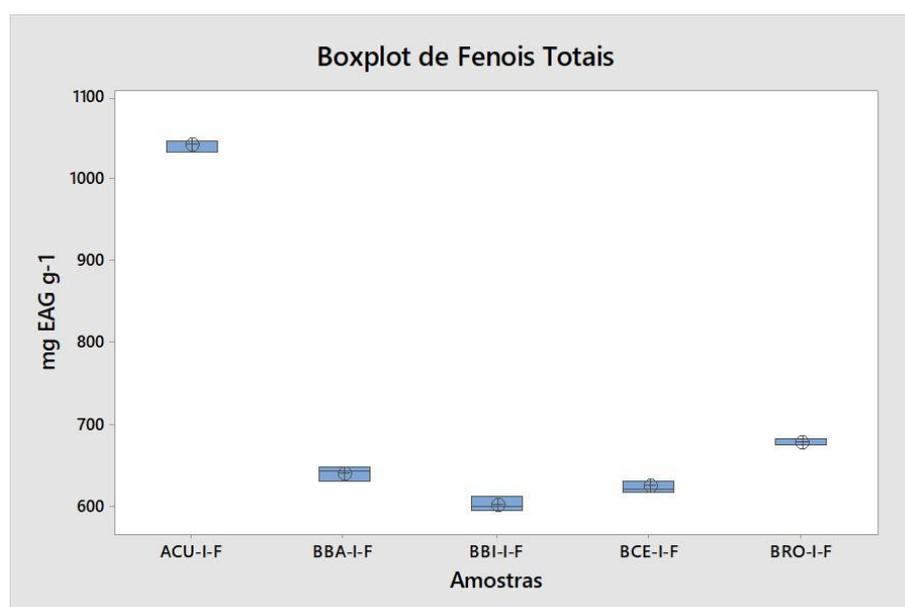
**Figura S 23.** Espectro de massas (modo negativo) representativo da bebida fermentada B18F.

## Apêndice IV

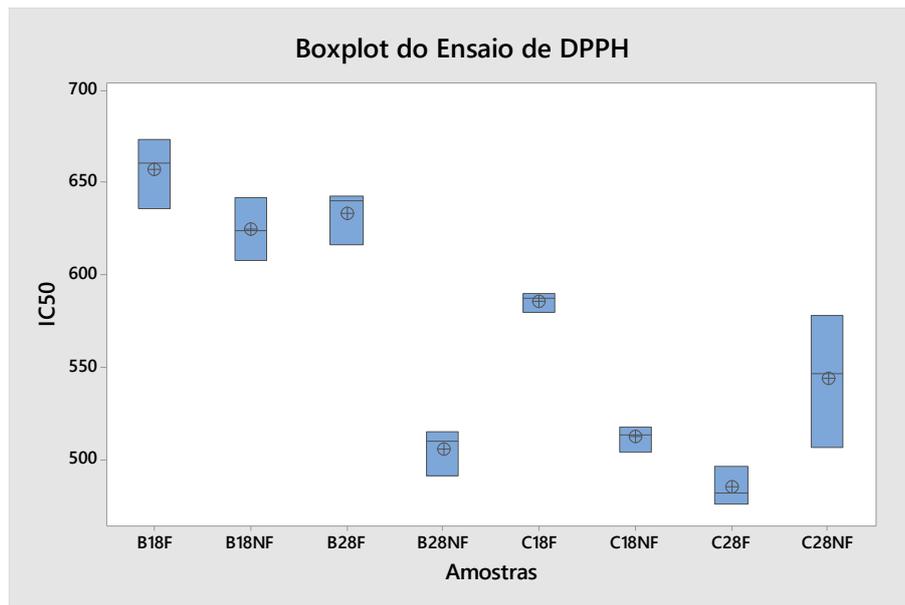
## Potenciais antioxidantes



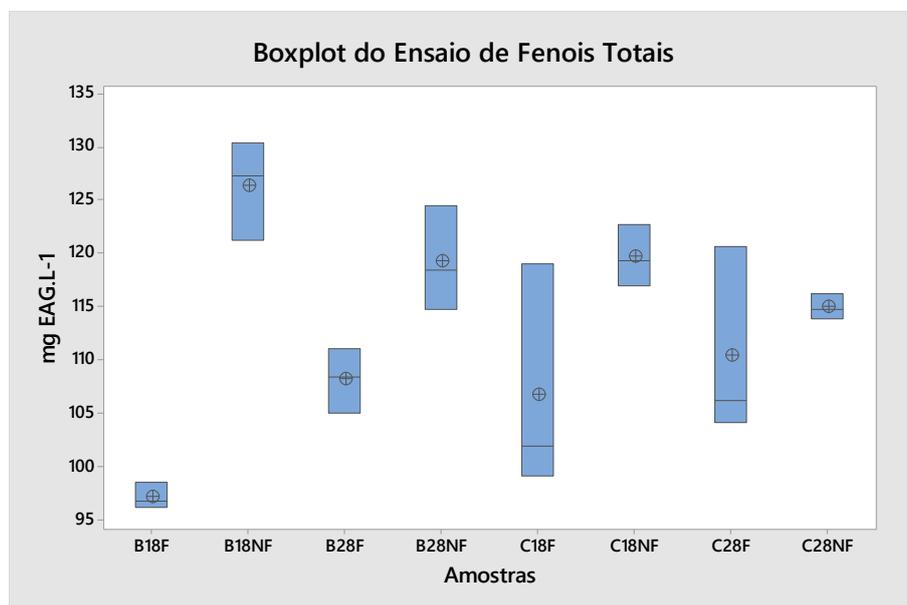
**Figura S 24.** Boxplot da Análise de Variância dos resultados do ensaio de DPPH das amostras das bebidas produzidas no estágio I.



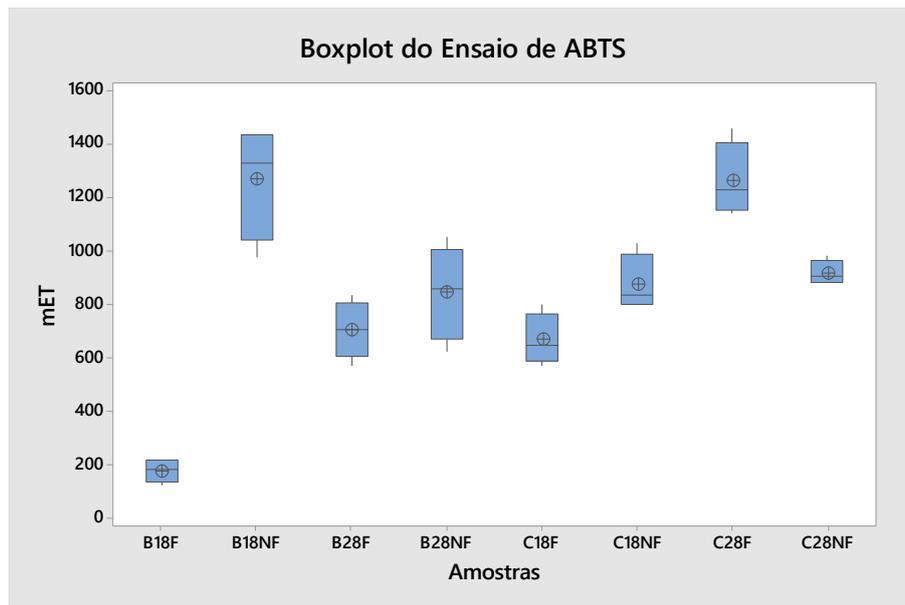
**Figura S 25.** Boxplot da Análise de Variância dos resultados do ensaio de Fenóis Totais das amostras das amostras das bebidas produzidas no estágio I.



**Figura S 26.** Boxplot da Análise de Variância dos resultados do ensaio de DPPH das amostras das bebidas produzidas com o planejamento fatorial.



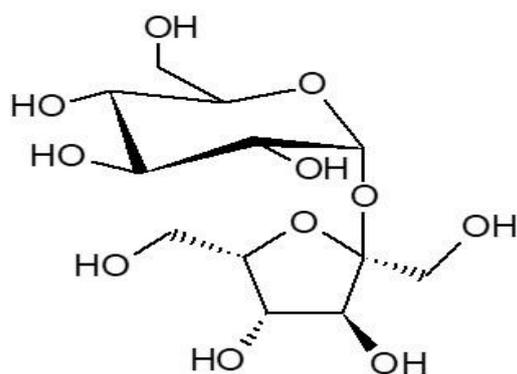
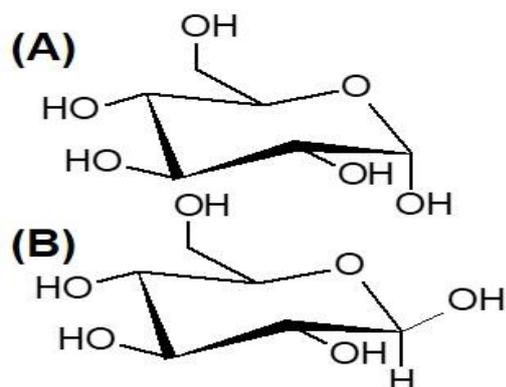
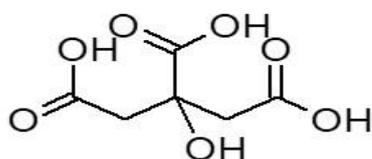
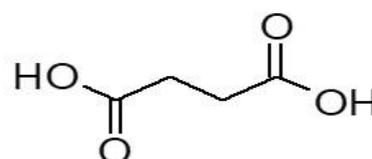
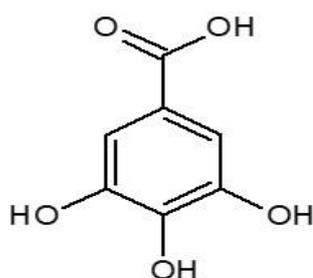
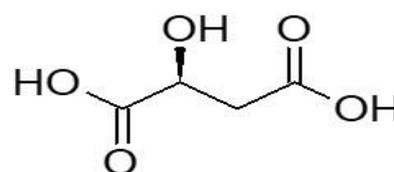
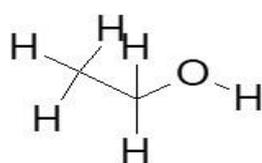
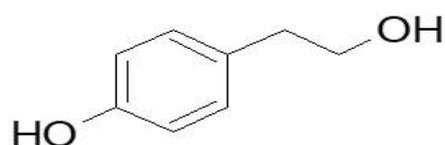
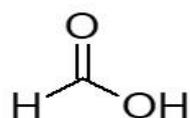
**Figura S 27.** Boxplot da Análise de Variância dos resultados do ensaio de Fenóis Totais das amostras das bebidas produzidas com o planejamento fatorial.



**Figura S 28.** Boxplot da Análise de Variância dos resultados do ensaio de ABTS das amostras das bebidas produzidas com o planejamento fatorial.

## Apêndice V

## Substâncias identificadas nos fermentados alcoólicos de araçá-boi

**Sacarose****(A)  $\alpha$ -Glucose; (B)  $\beta$ -Glucose****Ác. cítrico****Ác. succínico****Ác. gálico****Ác. málico****Etanol****Tirosol****Ác. fórmico**