



**Produção de bebidas inovadoras à base de maçã**

Ana Margarida Ribeiro Mangerona

UMINHO | Dezembro de 2021

Ana Margarida Ribeiro Mangerona

**Produção de bebidas inovadoras à base de maçã**

Dezembro de 2021





**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Ana Margarida Ribeiro Mangerona

## **Produção de bebidas inovadoras à base de maçã**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho realizado sob orientação de

**Professor Doutor Engenheiro António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente**

E com a supervisão de

**Doutor João Filipe Lourenço Gomes Calais**

Dezembro de 2021

## **Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por parte de terceiros**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição-NãoComercial**  
**CC BY-NC**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## **Agradecimentos**

De um ponto de vista geral, dissertação é a exposição sobre um ponto literário ou científico. Para um aluno significa o fim de um ciclo. Um ciclo cheio de histórias, momentos e pessoas, erros e aprendizagens. Todos igualmente importantes e decisivos.

Começo por agradecer todo o apoio da minha família desde sempre em quaisquer que fossem as minhas decisões. Com especial atenção ao último ano, onde saber que tinha as costas protegidas por eles me garantiu a tranquilidade necessária para saber que, fosse qual fosse o desfecho final, poderia contar com eles.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo destes cinco anos. Saber que estávamos todos no mesmo barco possui, claramente, um efeito calmante e reconfortante. Saber que “somos todos um” é algo enriquecedor.

Quero agradecer ao Professor António Vicente pela sua disponibilidade e pela paciência. Agradeço também pela oportunidade de trabalhar no LIP, pelo conhecimento que me transmitiu e pelas condições de trabalho, ambas fundamentais ao desenvolvimento de todo o projeto.

Agradeço ao Professor Luís Abrunhosa, pela ajuda no decurso do trabalho experimental e pela disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas e pelo apoio constante ao longo do trabalho.

Ao Doutor João Calais e ao Engenheiro Henrique Menezes agradeço pela oportunidade de criar algo novo.

Um agradecimento especial a todos os investigadores do LIP pelo companheirismo, pelo excelente ambiente de trabalho e pela ajuda sempre que pedida.

Por fim, quero agradecer a mim mesma. Por ser resiliente.

## **Declaração de integridade**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Declaro que conheço e respeito o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Produção de bebidas inovadoras à base de maçã

### Resumo

Com o presente trabalho pretendeu-se dar uso às maçãs que não podem ser vendidas: produzindo um sumo que juntasse as vantagens da maçã, a matéria-prima, aos benefícios dos microrganismos probióticos e produzindo um vinagre para garantir a utilização das maçãs que se encontrassem numa fase de maturação mais avançada.

Alimentos funcionais são alimentos que para além do valor nutricional ainda têm efeitos metabólicos e fisiológicos no organismo do consumidor. Alimentos probióticos são, por sua vez, alimentos que regulam o equilíbrio intestinal do consumidor, melhorando a sua saúde. Habitualmente este tipo de produtos são consumidos na forma de iogurtes, no entanto, por causa da intolerância à lactose nem todas as pessoas têm acesso a tais produtos naturalmente nutricionais. Assim, aliou-se a maçã a um microrganismo probiótico: a bactéria láctica *Lactocaseibacillus casei*. Por sua vez, apesar de não ser tão reconhecido como tal, o vinagre também é caracterizado como um alimento funcional graças às inúmeras vantagens associadas ao seu consumo.

De forma a obter um sumo probiótico, obteve-se sumo de maçã e inoculou-se com *Lactocaseibacillus casei*, estudando a adaptação da bactéria com a presença e ausência de extrato de levedura. Para obter o vinagre, inoculou-se sumo de maçã com fermento de padeiro e posteriormente com vinagre não pasteurizado ou com *Acetobacter syzygii*.

Relativamente ao sumo, verificou-se que na presença de extrato de levedura, a bactéria cresce mais rapidamente, consome mais açúcares e, conseqüentemente, produz mais ácido láctico. Na presença de extrato de levedura, a bactéria produz mais do dobro de ácido láctico comparativamente quando a bactéria não tem extrato de levedura no meio. Foram feitas análises sensoriais onde foram comparados sumos fermentados e não fermentados, daqui concluiu-se que os provadores tiveram mais preferência pelos sumos não fermentados. Por outro lado, entre os sumos fermentados, o sumo de maçã Golden Delicious foi o que obteve melhor apreciação, tendo sido caracterizado como o melhor nos parâmetros de aspeto geral, cor, aroma, sabor, doçura e apreciação global, por outro lado.

Relativamente ao vinagre, verificou-se que para o vinagre não pasteurizado, obteve-se melhores resultados quando não houve remoção do inóculo da fermentação alcoólica, obtendo-se um rendimento de  $1,82 \text{ g}_{\text{ácido acético}}/\text{g}_{\text{etanol}}$ . Por outro lado, o procedimento que obteve melhor produtividade em ácido acético foi o procedimento onde o fermentado da fermentação alcoólica foi apenas centrifugado, obtendo-se uma produtividade de  $2,88 \text{ g}/(\text{L d})$  de ácido acético. Quando se usou a bactéria acética, obteve-se baixos valores de rendimento e de produtividade em ácido acético:  $0,16 \text{ g}_{\text{ácido acético}}/\text{g}_{\text{etanol}}$  e  $0,04 \text{ g}/(\text{L d})$ , respetivamente. Assim, o uso de vinagre não pasteurizado obtém melhores resultados comparativamente ao uso de uma bactéria.

Palavras-chave: sumo probiótico; vinagre; maçã; *Lactocaseibacillus casei*;

## Production of innovative beverages from apple

### Abstract

The main goal of the current work was to avoid wasting apples that cannot be sold. To solve this problem functional beverages were produced: an apple beverage with probiotic function as well as an apple vinegar.

Functional food consists of food that beyond their nutritive value also have metabolic and physiological effects on the body of the consumer. Probiotic food is food that regulate the intestinal balance of the consumer, improving their health. These types of products are typically consumed as yogurt, however, due to lactose intolerance, not all human beings can consume such nutritional products. This way, apple juice was inoculated with a probiotic microorganism: the lactic bacteria *Lactocaseibacillus casei*. However, even though it is not recognized as such vinegar is also characterized as functional food due to the numerous advantages associated with its consumption.

In order to obtain a probiotic juice, apple juice was obtained and inoculated with *Lactocaseibacillus casei*, afterwards the adaptation of the bacteria with the presence and absence of yeast extract was studied. On the other hand, to obtain the vinegar, apple juice was inoculated with yeast and then with unpasteurized vinegar or *Acetobacter syzygii*.

Regarding the juice, it was found that in the presence of yeast extract, the bacteria grow faster, consume more sugars, and consequently produce more lactic acid. In the presence of yeast extract, the bacteria produce more than twice as much lactic acid compared to when the bacteria do not have yeast extract in the medium. Sensory analyzes were carried out where fermented and non-fermented juices were compared, from which it was concluded that the tasters had more preference for non-fermented juices. However, among the fermented juices, Golden Delicious juice was the one that got the best appreciation, having been characterized as the best in terms of general appearance, color, aroma, flavor, sweetness and global appreciation.

Regarding vinegar, it was found that for unpasteurized vinegar, better results were obtained when there was no removal of the inoculum from the alcoholic fermentation, obtaining a yield of  $1,82 \text{ g}_{\text{acetic acid}}/\text{g}_{\text{ethanol}}$ . On the other hand, the procedure that obtained the best productivity in acetic acid was the procedure where the fermentation from alcoholic fermentation was only centrifuged, obtaining a productivity of  $2,88 \text{ g}/(\text{L d})$  of acetic acid. When acetic bacteria were used, low yield and productivity values in acetic acid were obtained:  $0,16 \text{ g}_{\text{acetic acid}}/\text{g}_{\text{ethanol}}$  and  $0,04 \text{ g}/(\text{L d})$ , respectively. In short unpasteurized vinegar showed better results than when using a single strain of bacteria.

Key-words: probiotic beverage; vinegar; apple; *Lactocaseibacillus casei*

## Índice

1	Objetivo .....	1
2	Introdução .....	2
2.1	Maçã .....	2
2.1.1	As diferentes variedades da maçã consumidas pelos Portugueses .....	3
2.1.2	Importância nutricional da maçã .....	5
2.2	Alimentos funcionais .....	5
2.2.1	Alimentos probióticos.....	6
2.2.2	Efeitos benéficos dos probióticos .....	7
2.2.3	Probióticos na indústria alimentar .....	8
2.3	Vinagre .....	8
2.3.1	Processos de fabrico.....	9
2.3.2	Composição do vinagre.....	12
2.3.3	Legislação .....	13
2.3.4	Vantagens do consumo de vinagre .....	14
2.4	Microrganismos .....	15
2.4.1	Leveduras .....	16
2.4.2	Bactérias Acéticas .....	16
2.4.3	Bactérias láticas .....	17
3	Metodologia .....	18
3.1	Sumo de maçã.....	18
3.1.1	Preparação do sumo .....	18
3.1.2	Obtenção e ativação do microrganismo.....	19
3.1.3	Formulação do sumo com o microrganismo e fermentação .....	19
3.1.4	Análise da absorbância.....	19
3.2	Vinagre de maçã .....	19
3.2.1	Preparação do sumo .....	20

3.2.2	Obtenção e ativação dos microrganismos.....	20
3.2.3	Formulação do sumo com os microrganismos e fermentação.....	21
3.2.4	Determinação da acidez total.....	21
3.3	Análise do pH e do °Brix.....	22
3.4	Análise dos açúcares e ácidos orgânicos por HPLC.....	22
3.5	Análise sensorial.....	24
4	Resultados e discussão.....	26
4.1	Sumo.....	26
4.1.1	Ensaio preliminar (1º ensaio).....	26
4.1.2	Fermentações simples (2º e 3º ensaios).....	27
4.1.3	Fermentação com adição de extrato de levedura (4º ensaio).....	32
4.1.4	Análise sensorial.....	37
4.2	Vinagre.....	39
4.2.1	Evolução do °Brix e do pH.....	39
4.2.2	Teor de ácidos e açúcares.....	43
4.2.3	Acidez total.....	48
5	Conclusão.....	51
	Bibliografia.....	53
	Anexos.....	58

## Lista de figuras

Figura 1: Produção de maçã expressa como peso em função do ano de produção (adaptado de [3])... 2	2
Figura 2: Variedades de maçã de cor avermelhada: A - Maçã Casanova de Alcobaça [11], B - Maçã Red Delicious [12], C - Maçã Fuji [12], D - Maçã Pink [13], E - Maçã Jonagold [12], F - Maçã Royal Gala [12]. ..... 4	4
Figura 3: Variedades de maçã de cor esverdeada: A - Maçã Golden Delicious [12].; B . Maçã Reineta [15]; C - Maçã Granny Smith [12]. ..... 4	4
Figura 4: Esquema representativo das doenças alvo dos microrganismos probióticos nos vários órgãos (adaptado de [27]). ..... 7	7
Figura 5: Imagem ilustrativa do Método lento [39]. ..... 10	10
Figura 6: Esquema do tanque usado no Método rápido; A- grade de arejamento; B- ripas de madeira; C- bomba para movimentação do líquido; D- dispersor do substrato; E- refrigerante de água; F- dispositivo de condensação de vapores (adaptado de [39]). ..... 11	11
Figura 7: Esquema do tanque usado no Método submerso; a- turbina de ar; b- compensador de ar; c- dispositivo para recolher o líquido resultante da condensação; d/e- dispositivo controlador da formação de espuma; f- dispositivo para medir o teor alcoólico; g- serpentina de refrigeração; h- dispositivo para refrigeração; i- termómetro; j- bomba para entrada do substrato alcoólico; k- bomba para retirar o vinagre (adaptado de [39])..... 12	12
Figura 8: Curva de crescimento biológico em meio de cultura (adaptado de [45]). ..... 15	15
Figura 9: Filtro 0,22 µm PES usado na filtração das amostras de HPLC. .... 23	23
Figura 10: Vial usado para armazenar as amostras de HPLC:..... 23	23
Figura 11: Evolução do °Brix em função do tempo para o 1º ensaio. .... 27	27
Figura 12: Evolução do pH em função do tempo para o 1º ensaio. .... 27	27
Figura 13: Absorbância lida a 600 nm para as amostras do 1º ensaio..... 27	27
Figura 14: Evolução do °Brix ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B), Royal Gala (C) e Granny Smith (D) onde não foi adicionados componentes extra. .... 28	28
Figura 15: Evolução do pH ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B), Royal Gala (C) e Granny Smith (D) onde não foi adicionados componentes extra. .... 29	29
Figura 16: Evolução da absorbância a 600 nm ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B), Royal Gala (C) e Granny Smith (D) onde não foi adicionados componentes extra. .... 30	30

Figura 17: Evolução da fermentação ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B), Royal Gala (C) e Granny Smith (D) onde não foi adicionados componentes extra: <span style="color: orange;">→</span> [Açúcares totais] (g/L); <span style="color: green;">▲</span> [Etanol] (g/L); <span style="color: yellow;">→</span> [Ácido láctico] (g/L).....	31
Figura 18: Evolução do °Brix ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B) e Royal Gala (C) onde foi adicionado extrato de levedura. ....	33
Figura 19: Evolução do pH ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B) e Royal Gala (C) onde foi adicionado extrato de levedura. ....	33
Figura 20: Evolução da absorbância a 600 nm ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B) e Royal Gala (C) onde foi adicionado extrato de levedura. ....	34
Figura 21: Evolução da fermentação ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B) e Royal Gala (C) onde foi adicionado extrato de levedura. <span style="color: orange;">→</span> [Açúcares totais] (g/L); <span style="color: green;">▲</span> [Etanol] (g/L); <span style="color: yellow;">→</span> [Ácido láctico] (g/L). ....	35
Figura 22: Resultados médios da prova sensorial do sumo de maçã da variedade Fuji.....	37
Figura 23: Resultados médios da prova sensorial do sumo de maçã da variedade Golden Delicious...	38
Figura 24: Resultados médios da prova sensorial do sumo de maçã da variedade Royal Gala. ....	38
Figura 25: Evolução do °Brix durante as várias fermentações alcoólicas ao longo do tempo: <span style="color: green;">◆</span> - vinagre do 1º ensaio; <span style="color: blue;">■</span> - vinagre do 2º ensaio; <span style="color: yellow;">■</span> - vinagre do 3º ensaio; <span style="color: orange;">■</span> - vinagre do 4º ensaio.	40
Figura 26: Evolução do pH das fermentações alcoólicas ao longo do tempo: <span style="color: green;">◆</span> - vinagre do 1º ensaio; <span style="color: blue;">■</span> - vinagre do 2º ensaio; <span style="color: yellow;">■</span> - vinagre do 3º ensaio; <span style="color: orange;">■</span> - vinagre do 4º ensaio. ....	41
Figura 27: Evolução dos SST ao longo das fermentações acéticas: <span style="color: green;">◆</span> - vinagre do 1º ensaio; <span style="color: blue;">■</span> - vinagre do 2º ensaio; <span style="color: yellow;">■</span> - vinagre do 3º ensaio; <span style="color: orange;">■</span> - vinagre do 4º ensaio.....	42
Figura 28: Evolução do pH ao longo das várias fermentações acéticas: <span style="color: green;">◆</span> - vinagre do 1º ensaio; <span style="color: blue;">■</span> - vinagre do 2º ensaio; <span style="color: yellow;">■</span> - vinagre do 3º ensaio; <span style="color: orange;">■</span> - vinagre do 4º ensaio. ....	43
Figura 29: Evolução da concentração dos substratos e produtos ao longo da fermentação do vinagre do 1º ensaio: <span style="color: orange;">→</span> [Açúcares totais] (g/L); <span style="color: green;">▲</span> [Etanol] (g/L); <span style="color: blue;">→</span> [Ácido acético] (g/L).....	44
Figura 30: Evolução da concentração dos substratos e produtos ao longo da fermentação do vinagre do 3º ensaio: <span style="color: orange;">→</span> [Açúcares totais] (g/L); <span style="color: green;">▲</span> [Etanol] (g/L); <span style="color: blue;">→</span> [Ácido acético] (g/L).....	45
Figura 31: Evolução da concentração dos substratos e produtos ao longo da fermentação do vinagre do 4º ensaio: <span style="color: orange;">→</span> [Açúcares totais] (g/L); <span style="color: green;">▲</span> [Etanol] (g/L); <span style="color: blue;">→</span> [Ácido acético] (g/L).....	47
Figura 32: Evolução da acidez total ao longo da fermentação acética ( $t_s$ ) do vinagre: A - 1º ensaio; B - 2º ensaio; C - 3º ensaio.....	49

## **Lista de tabelas**

Tabela 1: Microrganismos com propriedades probióticas (adaptado de [18]) .....	6
Tabela 2: Condições estudadas nos diferentes ensaios do sumo probiótico .....	18
Tabela 3: Condições estudadas nos diferentes ensaios da produção de vinagre.....	20
Tabela 4: Concentrações dos respetivos compostos analisados usados para obter a primeira curva de calibração .....	24
Tabela 5: Concentrações dos respetivos compostos analisados usados para obter a segunda curva de calibração .....	24
Tabela 6: Produtividade e rendimento em etanol e produtividade e rendimento em ácido acético.....	48

# 1 Objetivo

Estima-se que em Portugal se produzam 350 mil toneladas de maçãs anualmente. Desta quantidade, cerca de 20 % não chega a ser consumida por não estar integrada nos padrões definidos pela União Europeia como fruta aceitável para venda [1].

O desenvolvimento de uma empresa está dependente da sua capacidade de inovação. Atualmente, com a preocupação pelo meio ambiente e com a sustentabilidade da sobrevivência humana, tenta-se que inovação e sustentabilidade evoluam lado a lado, nunca descuidando a qualidade do produto.

O objetivo principal deste trabalho foi juntar ambos estes fatores: a sustentabilidade da produção de fruta e a inovação: procurando novas formas de usar a maçã que não pode ser vendida e acaba por ser desperdiçada através da produção de um sumo que traga vantagens nutricionais para o consumidor. Assim, tentou-se desenvolver um sumo probiótico.

Para cumprir o objetivo, foi estudada a fermentação láctica de sumo de maçã com bactérias probióticas. A bactéria escolhida foi a *Lactocaseibacillus casei*.

De forma a utilizar também as maçãs que se apresentassem num estado de maturação mais avançado, e que não poderiam ser usadas para o sumo, foi também estudada a produção de vinagre de maçã.

## 2 Introdução

### 2.1 Maçã

A maçã, de nome científico *Malus domestica Borkh*, é dos frutos mais consumidos pelo homem, seja na sua forma mais simples, como fruto, seja incluída em sumos, pratos principais, sobremesas ou acompanhamentos.

Estima-se que a maçã seja um fruto inicialmente proveniente das montanhas da Ásia, tendo-se espalhado pelo resto do mundo através da intenção de venda, através dos animais ou por causas naturais [2].

Através da sua dispersão foi possível chegar às agora cerca de 7500 variedades de maçã existentes.

A nível mundial há atualmente a produção de cerca 80 milhões de toneladas de maçã, estando o continente asiático responsável por cerca de 65 % da produção total. Na Figura 1 pode-se comparar a produção de maçã, em toneladas, nos vários continentes. Aqui verifica-se que a China é responsável por 50 % da produção total [3].

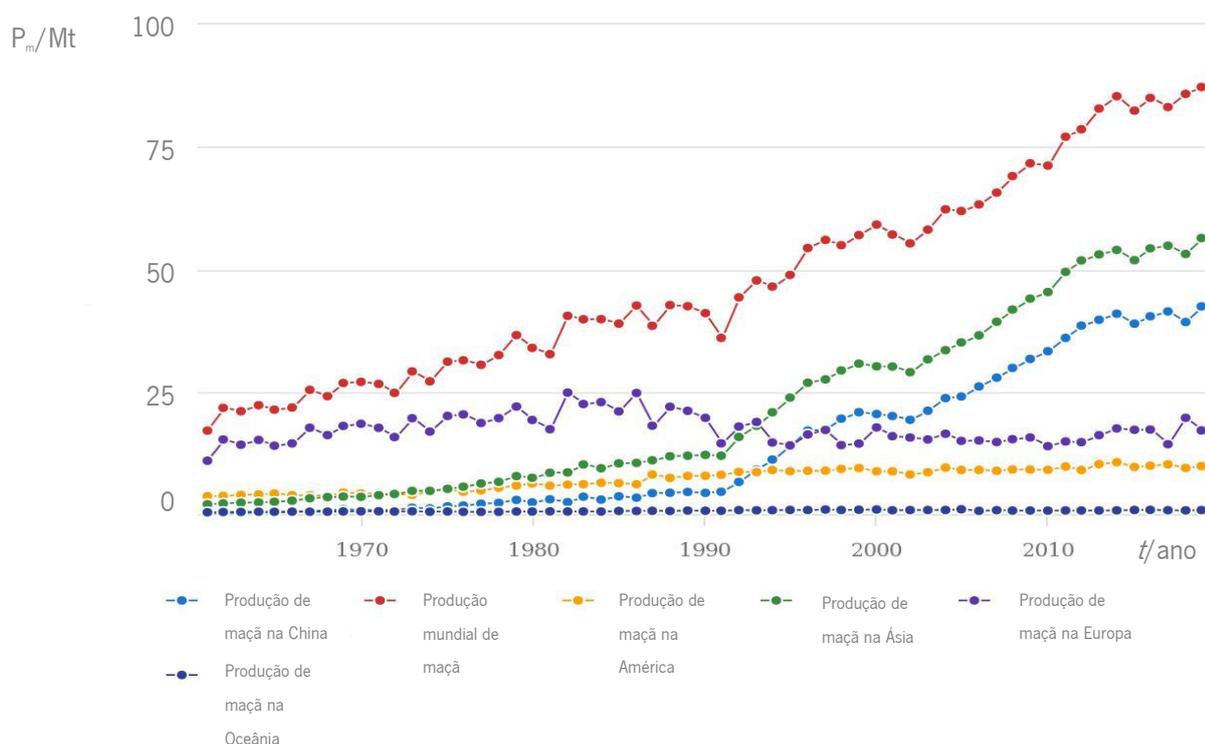


Figura 1: Produção de maçã expressa como peso em função do ano de produção (adaptado de [3]).

Independentemente da quantidade de fruta ou vegetal produzido, o interesse do consumidor pelo produto só se mantém se este tiver qualidade e, neste caso, se enquadrar nos gostos do consumidor. A qualidade final de um fruto está dependente de todos os passos desde a recolha da sua semente até à sua colheita. Apesar de ser possível plantar uma macieira através de uma semente, de forma a manter a qualidade do produto entre gerações é costume optar-se pelo método de enxertia, onde é possível controlar ao máximo possível que o seu aspeto e o seu sabor se mantêm entre gerações [4]. Para além

do método de reprodução, há ainda alguns cuidados a ter com a planta para certificar que os frutos obtidos têm as características o mais semelhantes possível, controlando, por exemplo, o tipo de solo, a quantidade de sol que a árvore e o fruto apanham, bem como as condições meteorológicas a que está sujeita [4].

Em média, a maçã madura é constituída por 89 % de água (que capta uma grande quantidade de minerais, como o potássio, magnésio, cálcio e sódio), por 14 % de hidratos de carbono, 0,5 % de lípidos e 0,3 % de proteínas. Dos 14 % de hidratos de carbono, cerca de 80 % são açúcares, como a D-frutose, a D-glucose e a sacarose, a restante percentagem corresponde às fibras presentes na maçã [5]. Estas quantidades diferem consoante a variedade da maçã, a forma como é cultivada e onde é cultivada.

### 2.1.1 As diferentes variedades da maçã consumidas pelos Portugueses

Estima-se que em Portugal se produzam anualmente cerca de 350 mil toneladas de maçã, sendo a região de Alcobça a responsável por quase 20 % desse valor [1], [6].

Entre as variedades de maçãs mais escolhidas pelos portugueses estão a Golden Delicious, Casanova de Alcobça, Reineta, Red Delicious, Fuji, Jonagold, Royal Gala, Granny Smith e Pink [7].

As variedades de cor avermelhada são a maçã Casanova de Alcobça, a Red Delicious, a Fuji, a Pink, a Jonagold e a Royal Gala. A maçã Casanova de Alcobça é uma maçã nacional, cuja aparência exterior se caracteriza por ser vermelha, mas que pode apresentar manchas amarelas. É uma maçã sumarenta e agridoce [7]. A maçã Red Delicious, é uma maçã levemente doce e crocante [8]. Tem uma aparência avermelhada, com laivos amarelos. A maçã Fuji, é originária do Japão. É uma maçã bastante doce, sumarenta e firme [9]. A maçã Pink originária da Austrália, é uma maçã avermelhada com laivos amarelos. Apesar de apresentar um alto teor de açúcares, tem um sabor agridoce. É bastante sumarenta e crocante [7]. A maçã Jonagold é caracterizada pelo tamanho grande, cor vermelha forte e sabor bastante doce [10]. A maçã Royal Gala é uma maçã grande, cuja altura é superior à sua largura e cujo sabor é também doce e com casca fina, mas com uma textura crocante [9]. Na Figura 2 estão representadas as maçãs de cor avermelhada.

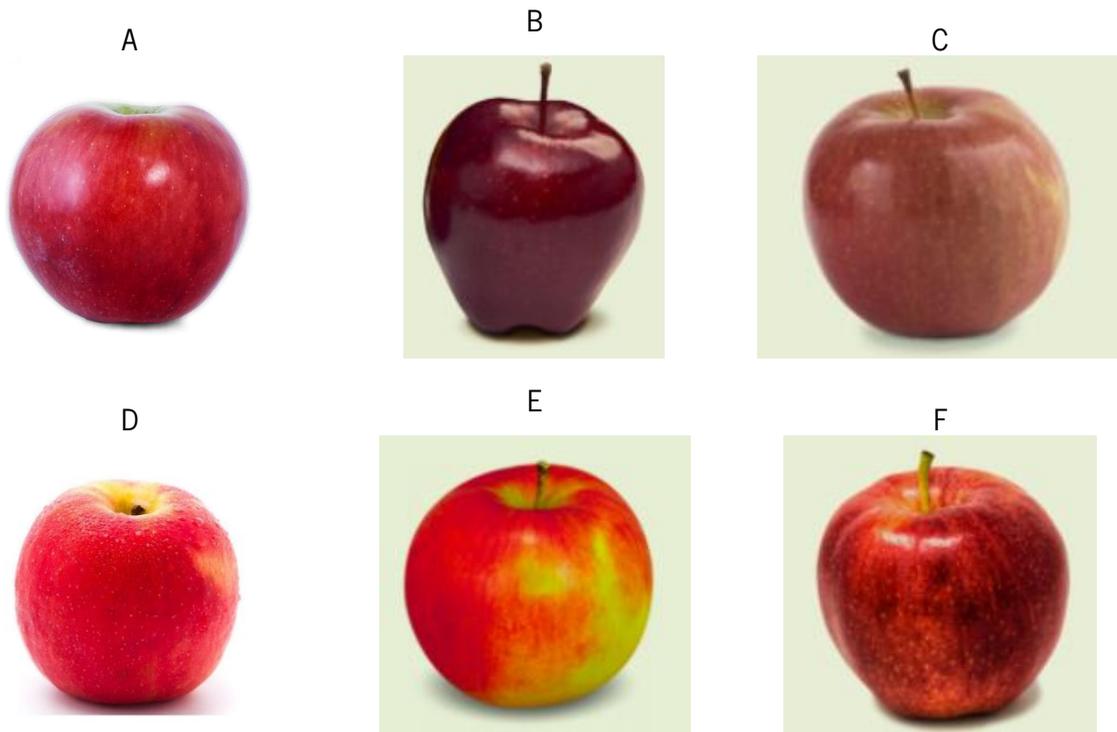


Figura 2: Variedades de maçã de cor avermelhada: A - Maçã Casanova de Alcobaça [11], B - Maçã Red Delicious [12], C - Maçã Fuji [12], D - Maçã Pink [13], E - Maçã Jonagold [12], F - Maçã Royal Gala [12].

Já as maçãs das variedades Golden Delicious, Reineta e Granny Smith têm um aspeto entre o amarelo e o verde. A maçã Golden Delicious é uma maçã de aparência amarelada; é considerada uma maçã suave, de casca fina e frágil, não aguentando muito tempo sem começar a ficar marcada e com aspeto pouco agradável [9]. A maçã Reineta, originária da França, tem um aspeto rugoso cuja cor se destaca por uma mistura de castanho com vermelho. É uma maçã doce, mas com sabor afarinhado. O seu formato é arredondado e achatado no topo e no fundo [14]. A maçã Granny Smith também com origem australiana, possui uma pele brilhante que apesar de verde, começa a criar um toque de vermelho quando começa a amadurecer. É uma maçã tipicamente dura e ácida, mas que após cozida, adoça [9]. Na Figura 3 estão representadas as maçãs Golden Delicious, Reineta e Granny Smith.

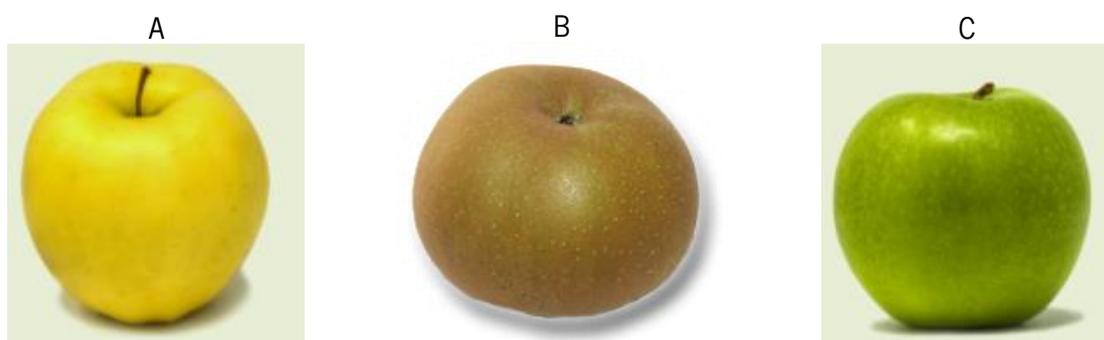


Figura 3: Variedades de maçã de cor esverdeada: A - Maçã Golden Delicious [12].; B . Maçã Reineta [15]; C - Maçã Granny Smith [12].

### 2.1.2 Importância nutricional da maçã

De uma forma geral, o consumo de qualquer fruta, seja em que formato for, traz bastantes vantagens, nomeadamente na eliminação de toxinas e no efeito diurético [16]. No entanto, o consumo da maçã, direta ou indiretamente, está cientificamente ligado a menores problemas de pulmões, como o cancro do pulmão e asma. O consumo da maçã está também relacionado com um menor risco de problemas cardiovasculares, assim como um menor risco de diabetes e a uma perda de peso mais eficiente [17]. Todas as vantagens do consumo da maçã estão ligadas aos componentes químicos presentes tanto na casca da maçã, como no seu interior: a sua grande concentração de flavonoides e de carotenoides garante a importância da maçã numa dieta saudável [17]. Ambos são compostos ligados aos produtos ditos “vindos da Terra”, podendo ser encontrados em produtos “cultivados”, como por exemplo vegetais, frutas e cereais, fornecendo-lhes a importância numa dieta saudável.

## 2.2 Alimentos funcionais

Após a Segunda Guerra Mundial, os hábitos alimentares dos japoneses aproximaram-se dos hábitos alimentares dos ocidentais: maior consumo de proteína animal, açúcares e gorduras saturadas. O que resultou na razão de morte dos japoneses aproximar-se da razão de morte dos ocidentais: morte por problemas relacionados com o coração, como é o caso de hipertensão, colesterol, diabetes e cancro, doenças relacionadas com a alimentação [18].

Para combater essas doenças e tentar salvar a saúde da sua população, o Ministério da Saúde e Bem-estar japonês decidiu criar um sistema que se responsabilizasse por ajudar a prevenir e combater doenças relacionadas com o estilo de vida das pessoas, o FOSHU (Food for Specified Health Use). Alguns dos alimentos incluídos nesse sistema assemelham-se ao que atualmente conhecemos por alimentos funcionais [18].

Qualquer alimento pode ser considerado como funcional, no entanto este termo é usado para especificar aqueles alimentos que, para além das funções nutricionais, ainda produzem efeitos metabólicos e fisiológicos no organismo que os consome, ajudando a reduzir o risco da incidência ou apoiando o organismo no combate a certas doenças [19].

Para que o efeito do consumo dos alimentos funcionais seja eficaz, é necessário que se registre um consumo regular, integrado numa dieta à base de frutas, verduras e cereais. Alguns dos componentes dos alimentos funcionais que lhes dão funcionalidade são os carotenoides, os flavonoides (presentes também na maçã), ácidos gordos (como é o caso do ómega-3), probióticos e fibras [19].

Quando se fala em alimentos funcionais pode-se referir os compostos bioativos, suplementos alimentares, ingredientes funcionais, produtos de saúde naturais e nutracêuticos [20]

Apesar do consumidor geral estranhar aquilo que é novo, produtos que estejam cientificamente ligados a um benefício para a saúde, são produtos que atraem a sua atenção. Apesar de comparativamente aos alimentos convencionais, os alimentos funcionais serem considerados inovadores, a aceitação e intenção de consumo destes alimentos está dependente do estilo de vida e de fatores demográficos (género, idade e nível educacional) do respetivo consumidor [21], [22].

### 2.2.1 Alimentos probióticos

Dentro dos alimentos funcionais, destacam-se os alimentos probióticos.

O termo “probiótico” tem origem grega e significa “para a vida”. Começou por ser usado para referir compostos que, quando corretamente utilizados eram capazes de estimular o crescimento de outros microrganismos [23]. Posteriormente, o termo foi redefinido para significar organismos vivos que, quando ingeridos, têm benefícios na flora bacteriana intestinal do hospedeiro [24].

Atualmente, quando se menciona alimentos probióticos, está-se a referir a alimentos que melhoram a saúde do consumidor através da regulação do equilíbrio intestinal com a repopulação direta desse meio [20]. Os probióticos são considerados como bioterapêuticos, bioprotetores ou bioprotetores dada a sua ação na melhoria das propriedades da microflora nativa [25].

A forma mais comum de probióticos são as bactérias lácticas, nomeadamente dos géneros *Lactocaseibacillus* e *Bifidobacterium*, uma vez que fazem parte da microbiota do intestino [20]. Na Tabela 1 referem-se alguns microrganismos usados em formulações probióticas.

Tabela 1: Microrganismos com propriedades probióticas (adaptado de [18])

<i>Lactocaseibacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias lácticas	Microrganismos não lácticos
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. deslbrueckii</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		

## 2.2.2 Efeitos benéficos dos probióticos

O efeito mais importante reconhecido dos microrganismos probióticos é o seu papel inibidor dos microrganismos patogênicos. No entanto, muitos outros efeitos têm sido registrados como é o caso de controlar a intolerância à lactose e à glucose, e a prevenção e tratamento de doenças como a hiperglicemia e a disfunção metabólica [26]. Na Figura 4 está representado um esquema que indica os efeitos dos probióticos nos vários órgãos do corpo humano.

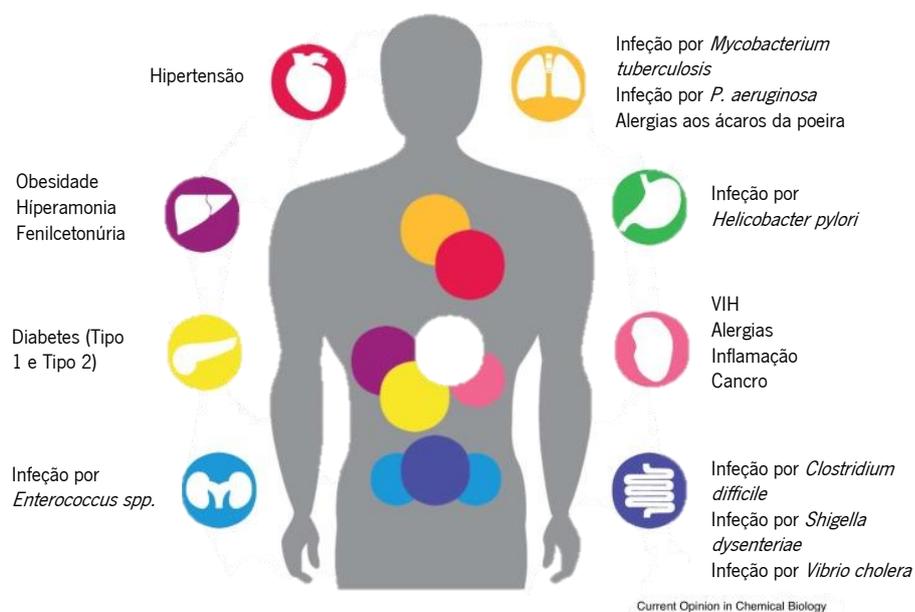


Figura 4: Esquema representativo das doenças alvo dos microrganismos probióticos nos vários órgãos (adaptado de [27]).

Para proteger a microflora intestinal e combaterem certas doenças, as bactérias probióticas competem e consomem os nutrientes que de outra forma seriam usados por agentes patogênicos para proliferarem [28] [29]. Por outro lado, o consumo por via oral de probióticos previne infecções em partes do corpo não diretamente ligadas ao intestino, como é o caso dos brônquios e das mucosas urogenitais [30]–[32]. Ao nível das alergias, o consumo de probióticos é uma solução no seu combate, uma vez que estes microrganismos são capazes de controlar a histamina responsável pela resposta alérgica, bem como ajudam a aliviar os sintomas associados a essa resposta [28]. Já para ajudar a combater o cancro, as bactérias probióticas envolvem-se em vários mecanismos, como por exemplo alterando a composição da flora intestinal, reduzindo o número de bactérias perigosas e patogênicas e reduzindo a reação anti-inflamatória até se dar a degradação de células potencialmente carcinogênicas ou afetar a sua proliferação [33], [34].

### 2.2.3 Probióticos na indústria alimentar

A nível industrial, os probióticos apresentam um grande potencial graças aos vários benefícios para a saúde dos consumidores. No entanto, para as culturas destes microrganismos serem utilizadas na produção de produtos alimentares, as culturas devem ser empregues com base no seu desempenho tecnológico para assim serem desenvolvidos produtos de aroma e textura adequados e que mantenham inalterada a função do microrganismo.

Alguns fatores que influenciam a viabilidade do produto final e das bactérias lá empregues são o género e espécie da bactéria escolhida, a formulação e composição do alimento e as condições em que o produto final é preparado e armazenado. Para garantir que a qualidade de ambos é fixa e não diminui ao longo da produção, deve-se estudar a multiplicação do alimento, as propriedades sensoriais adequadas e a estabilidade do produto durante o armazenamento.

A maioria dos produtos com probióticos no mercado provém de laticínios, como é o caso de leite fermentado, iogurtes, gelado e queijo [35]. Embora as bactérias lácticas ajudem a combater a intolerância à lactose e à glucose, não agem da mesma forma em todos os indivíduos alérgicos, pelo que foi necessário desenvolver novos produtos que não envolvessem laticínios na sua formulação, mas que permitissem o consumo de bactérias probióticas, como por exemplo sumos, bebidas não lácteas, alimentos à base de cereais e chocolate [26], [35].

## 2.3 Vinagre

A palavra vinagre resulta da aglutinação de “*vinu*” e “*acre*”, palavras do latim que significam “vinho” e “acre”, respetivamente [36]. O vinagre resulta da dupla fermentação (fermentação alcoólica e fermentação acética) de um líquido de origem agrícola.

Apesar de não se saber ao certo a origem do vinagre, há referências ao seu uso como conservante e enaltecedor de sabor datadas de 5000 a.C. Estima-se que os povos antigos o tenham descoberto aquando da descoberta da vinicultura de forma casual, ao deixarem o vinho em condições adequadas para a fermentação acética [37]. Desde então o vinagre tem sido usado de múltiplas formas: como bebida alcoólica dos mais desfavorecidos, uma vez que tinha origem no vinho que com o tempo perdia qualidade no sabor e, portanto, perdia valor monetário enquanto bebida alcoólica, como composto de produtos médicos ou como parte de receitas culinárias [38].

O vinagre pode ser obtido de duas formas, a primeira através do sumo de uma fruta que é colocado a fermentar alcoolicamente, onde através de leveduras ou bactérias os açúcares presentes no sumo são convertidos em etanol e, posteriormente, esse álcool é convertido em ácido acético por bactérias

acéticas; e a segunda onde vinho de fruta é deixado a maturar ao ar, sem controlo, e o etanol presente é diretamente convertido em ácido acético através das bactérias que se desenvolvem no meio ou que são adicionadas com esse propósito.

### 2.3.1 Processos de fabrico

No passado, o vinagre era produzido pela exposição da bebida alcoólica ao ar, sem nenhum controlo. Atualmente, com a evolução do conhecimento sobre os vários processos biotecnológicos envolvidos, a produção de vinagre é muito mais controlada e variada. Os métodos mais usados para a produção de vinagre são o Processo lento ou Processo de Orleães ou francês, o Processo rápido ou alemão e o Processo submerso.

#### **Processo lento ou Processo de Orleães ou Processo francês**

O Processo lento é o processo mais antigo usado na produção de vinagre e, tal como o nome indica, é um processo lento que consiste em colocar a matéria-prima em barricas de madeira semi-cheias, sujeitas a temperaturas altas, enquanto o substrato alcoólico fermenta, exposto ao ar [38].

De forma a permitir que o processo seja contínuo, há um orifício no topo na barrica para renovar o substrato e outro, com torneira, no fundo para retirar o vinagre no fim da fermentação [38].

Mais tarde, em Orleães, em França, o processo foi aperfeiçoado, o que deu o nome do país e da cidade ao processo. As bactérias acéticas apresentavam-se na forma de uma camada gelatinosa, tendo sido feitos buracos no topo da barrica, no sentido de melhorar o contacto das bactérias com o ar e assim aumentar a velocidade da fermentação. Para garantir que, de cada vez que era adicionado novo substrato, a camada de bactérias não sofria perturbações, ligou-se um tubo da entrada do orifício, no topo, até um ponto abaixo da camada de bactérias. Ainda para aumentar a velocidade do processo fermentativo estudou-se a relação entre a área superficial e o volume e concluiu-se que, com a barrica deitada, como há maior área de contacto entre o ar e as bactérias acéticas, o processo é mais rápido [38]. Na Figura 5 está representado um esquema da barrica.

De forma a iniciar o processo deve-se adicionar 10 % do volume útil da barrica de um vinagre não pasteurizado, ou seja, de bactérias ativas, para se formar a camada gelatinosa, e passado 15 dias, retirar 10 % desse volume e adicionar o mesmo volume de substrato alcoólico. A partir desse passo, a recolha e adição de substrato alcoólico pode ocorrer semanalmente [38].

Como este vinagre é produzido de forma lenta, dá-se o amadurecimento completo do produto, tornando o seu sabor mais suave e agradável, fornecendo ao produto uma qualidade superior aos vinagres produzidos por outros métodos [38].

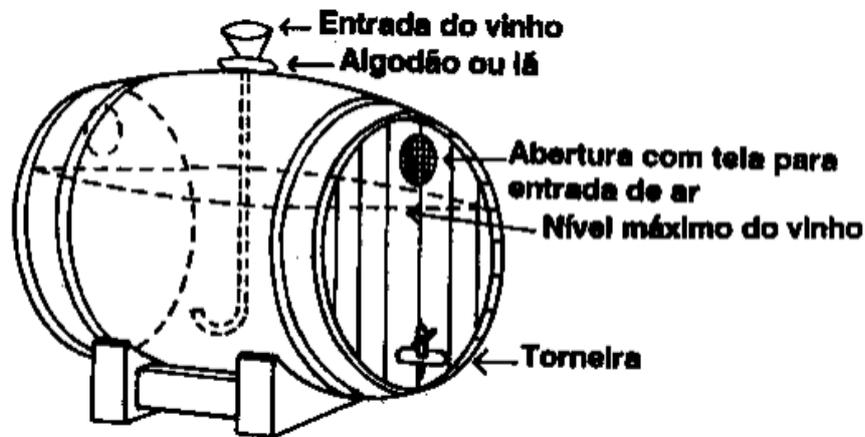


Figura 5: Imagem ilustrativa do Método lento [39].

### **Processo rápido ou Processo alemão**

Com origem na Alemanha no século XIX, este processo apresenta-se como uma versão mais rápida do Método lento.

Neste método utiliza-se um tanque cilíndrico dividido em três partes: a secção superior, onde o extrato alcoólico sofre o processo de avinagramento, a secção intermédia, preenchida por raspas de madeira ou sabugos de milho, que têm como função facilitar o arejamento das bactérias acéticas, e a parte inferior, onde é depositado o vinagre. A passagem entre secções é feita através de gotejamento graças à força gravítica. A entrada de ar é assegurada por orifícios localizados no fundo falso da segunda secção e o processo demora cerca de 10 dias até que se possa retirar cerca de 10 % do vinagre obtido [38].

Até todo o etanol ser convertido em ácido acético, o líquido que chega ao fundo do tanque, é reciclado para o topo para repetir o processo [37].

Na Figura 6 está representado um esquema do tanque cilíndrico onde é possível ver as várias secções do tanque.

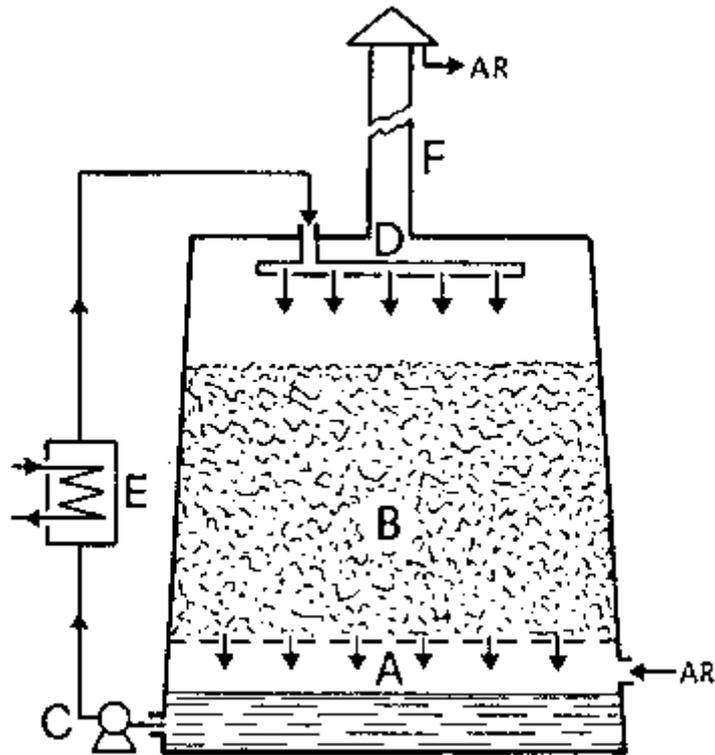


Figura 6: Esquema do tanque usado no Método rápido; A- grade de arejamento; B- ripas de madeira; C- bomba para movimentação do líquido; D- dispersor do substrato; E- refrigerante de água; F- dispositivo de condensação de vapores (adaptado de [39]).

### Processo submerso

É o processo usado atualmente na indústria do vinagre graças à sua elevada produtividade [37].

Num tanque de aço inoxidável é colocado o substrato alcoólico e as bactérias acéticas submersas nele. Pelo facto das bactérias estarem submersas, a oxigenação de todo o líquido tem de ser bem controlada em todos os pontos do tanque, para o que se usa ar comprimido injetado a partir do fundo do tanque. O teor alcoólico é medido ao longo do processo por um sensor interno [38].

O substrato alcoólico é colocado no tanque e inoculado com vinagre não pasteurizado ou bactérias acéticas. Após a primeira recolha, é necessário adicionar mais substrato ao tanque, bem como mais inóculo de bactérias acéticas. Para se repor as bactérias pode usar-se parte do vinagre retirado da primeira amostra. A partir daí, cerca de 25 % do volume do tanque pode ser retirado diariamente, registando-se um aumento de 4 % na acidez do vinagre por dia [38].

Na Figura 7 está representado o equipamento mais utilizado neste processo, tendo sido patenteado pela empresa Frings [39].

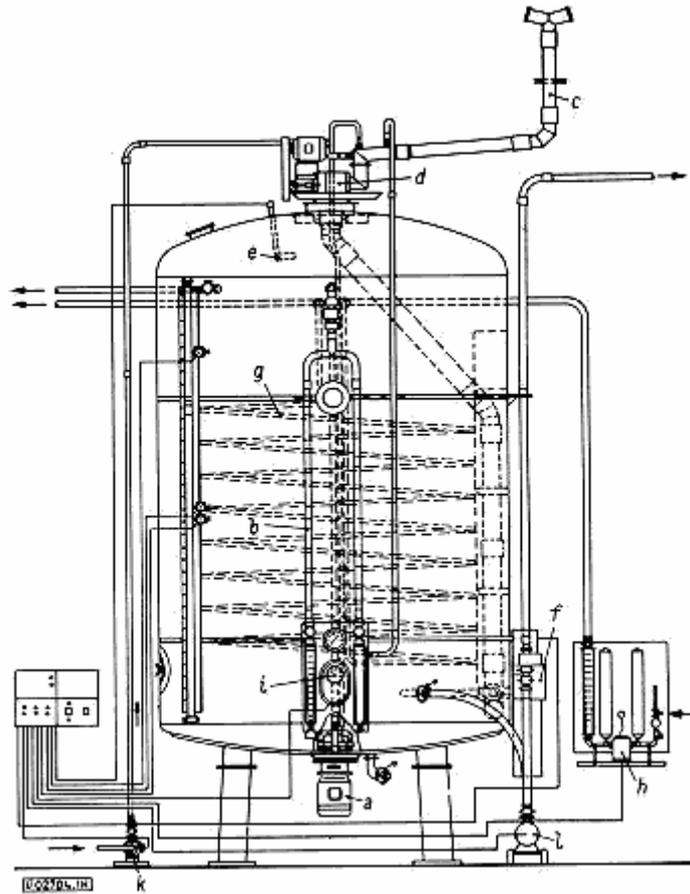


Figura 7: Esquema do tanque usado no Método submerso; a- turbina de ar; b- compensador de ar; c- dispositivo para recolher o líquido resultante da condensação; d/e- dispositivo controlador da formação de espuma; f- dispositivo para medir o teor alcoólico; g- serpentina de refrigeração; h- dispositivo para refrigeração; i- termómetro; j- bomba para entrada do substrato alcoólico; k- bomba para retirar o vinagre (adaptado de [39]).

### 2.3.2 Composição do vinagre

A composição de um vinagre depende da matéria-prima usada para a sua produção, no entanto os vinagres produzidos através da dupla fermentação de frutos ou de malte possuem uma composição mais complexa do que o vinagre de álcool, por conterem as mesmas substâncias solúveis que a matéria-prima. No entanto, de forma geral, o vinagre é constituído por:

- Ácido acético; principal constituinte do vinagre, é o produto final da fermentação acética e que fornece o sabor característico ao vinagre;
- Álcool etílico residual; produto da fermentação alcoólica e substrato da fermentação acética. Embora o objetivo final da fermentação acética seja obter o valor máximo de produção de ácido acético, as bactérias acéticas nem sempre consomem todo o álcool etílico presente no meio;

- Extrato seco; corresponde às substâncias não voláteis presentes no produto, tais como glicerol, pectinas, entre outras. A quantificação do extrato seco é importante para verificar se houve fraude na produção do vinagre;
- Cinzas; o teor de cinzas representa os minerais presentes no produto. O valor deste constituinte também permite determinar fraude na produção do vinagre [40].

### 2.3.3 Legislação

No Decreto-Lei nº 174/2007 de 8 de maio estão descritas as normas que os produtos e vendedores de vinagre devem cumprir. Nele, o vinagre é definido como um produto obtido do processo biológico de dupla fermentação, que inclui a fermentação alcoólica e a fermentação acética, de produtos de origem agrícola.

São distinguidos os tipos de vinagre quanto à sua origem, distinguindo:

- Vinagre de vinho, como sendo o vinagre obtido exclusivamente da fermentação acética de vinho;
- Vinagre de fruta e vinagre de bagas, como o vinagre obtido através de fruta ou bagas de fruta fermentadas alcoolicamente e aceticamente;
- Vinagre de sidra, o vinagre obtido da fermentação acética da sidra;
- Vinagre de álcool, o vinagre obtido da fermentação acética de álcool destilado;
- Vinagre de cereais, que é o vinagre obtido (sem recorrer a destilação intermédia) das fermentações alcoólica e acética, de cereais cujo amido tenha sido convertido em açúcares pela diástase de cevada maltada ou por qualquer outro processo;
- Vinagre de malte, vinagre obtido (sem destilação intermédia) pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de cevada maltada com ou sem a adição de cereais, cujo amido foi convertido em açúcares unicamente pelo processo da diastase de cevada maltada;
- Vinagre de malte destilado, é o vinagre obtido pela destilação do vinagre de malte, sob pressão reduzida, contendo apenas os constituintes voláteis do vinagre de malte de que deriva;
- Outros vinagres, são vinagres de outros produtos de origem agrícola que tenham passado pelas fermentações já mencionadas, nomeadamente de mel, de cerveja, entre outros;
- Vinagres aromatizados e vinagres com especiarias, são os vinagres referidos nas alíneas anteriores aos quais sejam adicionadas plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes, que sejam organolepticamente perceptíveis.

São definidas como matérias-primas adequadas para a produção de vinagre as matérias que se incluam nas seguintes características: conveniente estado de conservação, que se apresentem isentas de

substâncias ou matérias estranhas à sua normal composição, que não apresentem microrganismos patogénicos ou de substâncias destes derivados em níveis suscetíveis de prejudicarem a saúde do consumidor. No fabrico de vinagre com produtos do sector vitivinícola só podem ser utilizados vinhos cujas características estejam conformes com o estabelecido na legislação em vigor, podendo, contudo, apresentar excesso de acidez volátil.

Ao longo da produção de vinagre é permitido adicionar plantas ou partes de plantas que funcionem como aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes, sumos ou concentrados de fruta, mel, açúcar e sal. No entanto, é proibido adicionar aromatizantes artificiais, óleos de grainha de uva, resíduos de destilação, resíduos de fermentação ou outros subprodutos, substâncias extraídas de bagaço de todos os tipos e ácidos de todos os tipos, excepcionando os ácidos naturalmente contidos nas matérias-primas ou noutra substância cuja adição é permitida.

O produto final deve apresentar uma acidez total mínima, expressa em ácido acético, de 60 g/L caso seja vinagre de vinho e 50 g/L no caso de ser obtido por outras matérias-primas. O volume de álcool residual, expresso em volume, não deve ultrapassar 1,5 % no caso dos vinagres de vinho e 0,5 % no caso dos outros vinagres.

#### 2.3.4 Vantagens do consumo de vinagre

Desde o reconhecimento da sua existência que o vinagre é utilizado não só pelas suas qualidades como condimento, como também pelos seus benefícios à saúde de quem o consome.

Atualmente sabe-se que o vinagre tem efeito antioxidante, antidiabético, previne a formação de tumores e o aparecimento de doenças cardiovasculares. Todas estas vantagens estão relacionadas com a sua composição [41].

O facto de o vinagre ter na sua composição uma concentração significativa de ácido acético e de compostos fenólicos que garantem o seu efeito terapêutico: o ácido acético consegue passar a membrana celular de microrganismos patogénicos, levando à morte de bactérias prejudiciais à saúde, da mesma forma que consegue controlar a proliferação de células cancerígenas, tendo assim efeito anti-microbiológico e anti-tumoral. Os compostos fenólicos possuem efeito antioxidante, defendendo o organismo de stress oxidativo e conseguem inibir a oxidação de lipoproteínas, prevenindo doenças cardiovasculares [41].

Na sua forma geral, o consumo de vinagre está associado ao controlo de doenças como a obesidade e a diabetes pois controla o efeito glicémico e aumenta a velocidade de saciedade após uma refeição,

assim como diminui o nível de glicose no sangue. A nível cerebral, o vinagre melhora a função cognitiva e previne o aparecimento e controlo dos sintomas de pacientes com *Alzheimer* [41].

Comparando o que foi descrito sobre os alimentos funcionais com os efeitos do vinagre, bem como o porquê de o vinagre ser consumido, ou seja, para além de ser usado como condimento nas refeições, também é consumido pelos seus efeitos benéficos, é possível assumir que o vinagre é um alimento funcional.

## 2.4 Microrganismos

Os alimentos consumidos raramente são estéreis. Quer seja de forma propositada ou pelo simples desenvolvimento graças às condições favoráveis do alimento cru, vários microrganismos estão presentes nos géneros alimentícios. O desenvolvimento dos microrganismos depende das propriedades dos alimentos, da forma de como são armazenados e processados e das propriedades dos próprios microrganismos [42].

Na maioria das vezes, o desenvolvimento de microrganismos, como é o caso de vários tipos de fungos, está associado a alimentos impróprios para consumo. No entanto, há microrganismos capazes de produzir um efeito positivo nos alimentos através do seu desenvolvimento: no caso de certos fungos e algas podem ser ingeridos como componentes dos alimentos; no caso de outros tipos de microrganismos, podem alterar os alimentos, fornecendo-lhes novas propriedades, como alteração de sabor e aparência, benéficos para o consumidor [42].

Qualquer microrganismo, quando na presença de um meio propício, com nutrientes e substrato suficientes, desenvolve-se como uma curva de crescimento como a que se representa na Figura 8. Essa evolução celular pode ser estudada através da contagem direta dos microrganismos ou através da refração da luz pelo meio onde a bactéria está presente [43, 44].

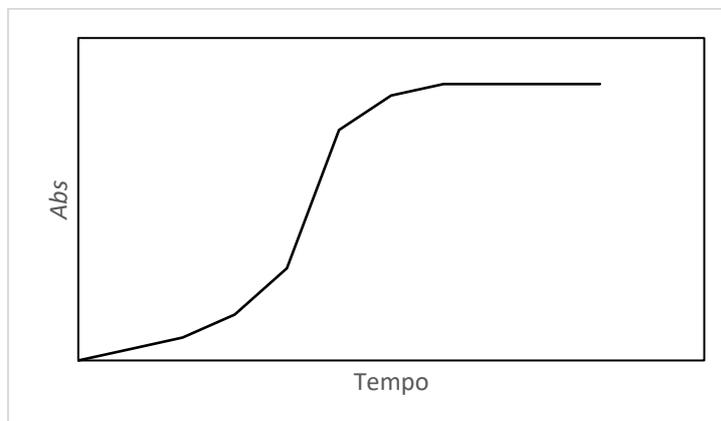


Figura 8: Curva de crescimento biológico em meio de cultura (adaptado de [45]).

### 2.4.1 Leveduras

Leveduras são microrganismos unicelulares pertencentes ao reino *fungi*. As leveduras são microrganismos capazes de sobreviver em meios ácidos, com concentrações de etanol até 18 % e meios concentrados de sacarose entre 55 % e 60 % [46]. A identificação e divisão de leveduras é muito importante em termos biotecnológicos pois garante a sua utilização de forma segura e com máximo rendimento [47].

A utilização das leveduras é bastante vasta: as leveduras podem ser usadas em indústrias como a da fermentação, por exemplo na produção de cervejas e bioetanol; na indústria alimentar e nas indústrias do ambiente e cuidados de saúde [47].

Apesar de haver mais de 70 géneros de leveduras conhecidas, apenas cerca de 14 são de origem alimentar. As leveduras mais usadas na indústria alimentar são as leveduras pertencentes aos géneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* [46].

### 2.4.2 Bactérias Acéticas

A fermentação acética é realizada por um conjunto de bactérias pertencentes à família *Acetobacteraceae*. Dentro desta família estão identificados 19 géneros e apenas 4 são responsáveis pela produção de vinagre: *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* e *Komagataeibacter* [48].

As bactérias acéticas são microrganismos aeróbicos, gram-negativos ou gram-variáveis, com crescimento ótimo a ocorrer a temperaturas entre 25 e 30 °C e pH ideal compreendido entre 5,0 e 6,5, conseguindo sobreviver em meios mais ácidos. Estas bactérias possuem alta capacidade para oxidar alcoóis na presença de oxigénio, distinguindo-se de outras bactérias pela sua capacidade em fazê-lo em meio ácido [48].

Na fermentação acética é costume usar culturas não puras, ou seja, culturas com mais do que um género de bactérias acéticas, pois diferentes bactérias atuam em diferentes momentos da fermentação. Por exemplo, num primeiro momento da fermentação, quando há menor concentração de ácido acético, as bactérias do género *Acetobacter* tem uma atuação mais ativa, e, quando o volume de ácido acético ultrapassa os 5 %, bactérias pertencentes ao género *Komagataeibacter* têm uma atividade predominante [48].

A produção de vinagre dá-se em condições bastantes ácidas o que implica a utilização de bactérias capazes de sobreviver em meio ácido. O alto rendimento de conversão de etanol em ácido acético é também uma característica procurada em bactérias acéticas para a produção de vinagre [48].

### 2.4.3 Bactérias láticas

A fermentação lática ocorre na presença de bactérias láticas.

As bactérias láticas são microrganismos gram-positivos, aerotolerantes e conseguem sobreviver em meio ácido [49]. Dividem-se em mais de 9 géneros, mas os géneros mais usados na indústria como cultura *starter* são *Lacticaseibacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* e enquadrados em produtos probióticos são *Lacticaseibacillus* e *Bifidobacterium* [50].

A fermentação por bactérias láticas pode-se dividir em dois tipos: fermentação homofermentativa caso o único produto obtido do consumo da glucose seja o ácido lático ou fermentação heterofermentativa no caso de, através do consumo da glucose, haver produção de ácido lático, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), etanol e ácido acético [49], [50].

As bactérias láticas podem ser encontradas em vários produtos como vegetais e frutas, produtos láticos, bem como em algumas partes do corpo humano, como é o caso dos intestinos, boca, sistema respiratório [49].

### 3 Metodologia

Ao longo do trabalho foram desenvolvidos quatro ensaios de fermentação, onde em cada um foi estudada pelo menos uma fermentação alcoólica, uma fermentação acética e uma fermentação láctica. Num primeiro ensaio foram determinadas as condições em que iria decorrer a fermentação, bem como os períodos ideais para a recolha das amostras. No segundo e terceiro ensaios foi estudado o processo fermentativo do sumo de maçã de diferentes variedades de maçã. No quarto e último ensaio foi produzido sumo fermentado de maçã ao qual se realizou uma análise sensorial.

No Anexo A estão referidos os equipamentos usados.

#### 3.1 Sumo de maçã

Para a produção do sumo de maçã estudaram-se as condições indicadas na Tabela 2: Condições estudadas nos diferentes ensaios.

*Tabela 2: Condições estudadas nos diferentes ensaios do sumo probiótico*

	Variedade	°Brix	Extrato de levedura
1º ensaio	Não discriminada	8	Não adicionado
	Fuji		
2º ensaio	Golden Delicious	10	Não adicionado
	Royal Gala		
	Granny Smith		
3º ensaio	Golden Delicious	8	Não adicionado
	Royal Gala		
	Fuji		
4º ensaio	Golden Delicious	7	Adicionado
	Royal Gala		

##### 3.1.1 Preparação do sumo

As maçãs foram lavadas com água corrente, descascadas e por fim trituradas recorrendo a um robot de cozinha da marca *Moulinex*. De seguida, a polpa obtida foi centrifugada a uma velocidade de 4000 min<sup>-1</sup> durante 20 minutos e seguidamente filtrada com um filtro *WHATMAN 0,2 µm Membrane Disc*. O sumo de maçã foi diluído em água destilada até perfazer um volume de 600 mL, mantendo uma concentração de 50 % de sumo de maçã no produto final. Por fim o °Brix foi corrigido para 8 com a

adição de sacarose no primeiro ensaio, para 10 no segundo ensaio, 8 no terceiro ensaio e por fim para 7 no quarto ensaio. Os valores de °Brix foram corrigidos para diferentes valores nos vários ensaios para estudar a evolução da fermentação e a concentração final de ácido láctico nas diferentes condições, tendo o cuidado de causar uma grande diferença entre o valor inicial e o valor corrigido para evitar alterações ao sumo inicial.

De forma a garantir que o sumo de maçã não seguiria a fermentação láctica com contaminantes indesejados, o sumo foi autoclavado antes de ser inoculado e foi sempre manuseado dentro de uma câmara de fluxo laminar, com material estéril.

### 3.1.2 Obtenção e ativação do microrganismo

Previamente ao início da fermentação, com 4 dias de antecedência, colocou-se a bactéria selecionada, *Lactocaseibacillus casei UM3*, a crescer em meio MRS *broth* (De Man, Rogosa e Sharpe) da marca *Merck* à temperatura ambiente.

### 3.1.3 Formulação do sumo com o microrganismo e fermentação

Ao sumo diluído previamente preparado adicionou-se 10 mL de MRS contendo o microrganismo ativado e deixou-se fermentar por 9 dias. As fermentações dos vários ensaios ocorreram numa incubadora orbital (*IKA 4000i control*), a 30 °C e com uma agitação de 180 min<sup>-1</sup>.

No último ensaio, adicionou-se extrato de levedura da marca *CULTIMED* numa concentração de 4 g/L. Durante todo o processo fermentativo foram retiradas amostras de 10 mL para análise do °Brix, do pH e de absorvância para estudar o crescimento microbiano e futura análise de HPLC para estudar a evolução dos substratos e produtos da fermentação.

### 3.1.4 Análise da absorvância

Para a leitura da absorvância recorreu-se a um espectrofotómetro (*Jasco V-560*) e ao programa *Spectra Manager*. Usou-se uma amostra com 5 mL que foi lida em cuvetes de 5 mL com um comprimento de onda de 600 nm.

## 3.2 Vinagre de maçã

Para a produção do vinagre estudaram-se as condições indicadas na Tabela 3: Condições estudadas nos diferentes ensaios.

Tabela 3: Condições estudadas nos diferentes ensaios da produção de vinagre

	°Brix	Autoclavagem	Centrifugação	Inóculo da fermentação acética
1° ensaio	10	Não	Sim	Vinagre não pasteurizado
2° ensaio		Sim	Não	
3° ensaio		Não	Não	
4° ensaio		Não	Sim	<i>Acetobacter syzygii</i>

### 3.2.1 Preparação do sumo

As maçãs foram lavadas com água corrente, descascadas e por fim trituradas recorrendo a um robot de cozinha da marca *Moulinex*. De seguida, a polpa obtida foi centrifugada a uma velocidade de 4000 min<sup>-1</sup> durante 20 minutos e seguidamente filtrada com um filtro *WHATMAN 0,2 μm Membrane Disc*. O sumo de maçã foi diluído em água destilada até perfazer um volume de 600 mL, mantendo uma concentração de 50 % de sumo de maçã no produto final. Por fim o °Brix foi corrigido com a adição de sacarose para 10 em todos os ensaios. O valor de °Brix foi assim corrigido para garantir a produção mínima de etanol, durante a fermentação alcoólica, em quantidade que permitisse uma produção mínima de ácido acético durante a fermentação acética, sem causar muitas alterações no sumo inicial.

De forma a garantir que o sumo de maçã não seguiria a fermentação alcoólica com contaminantes indesejados, o sumo foi autoclavado antes de ser inoculado e foi sempre manuseado dentro de uma câmara de fluxo laminar, com material estéril.

### 3.2.2 Obtenção e ativação dos microrganismos

A fermentação alcoólica procedeu-se com recurso à levedura *Saccharomyces cerevisiae* na forma de fermento de padeiro da marca *Vahiné*, usando-se 7,7 g/L.

Para iniciar a fermentação acética estudaram-se dois tipos de inóculo: vinagre-mãe e bactérias acéticas. Para os primeiros três ensaios usou-se vinagre não pasteurizado da marca *Biona Organic*. Para a quarta fermentação usou-se a bactéria *Acetobacter syzygii* cedida pelo Centro de Engenharia Biológica. Os inóculos foram escolhidos com base na sua fácil e rápida obtenção. A bactéria foi colocada a crescer em meio constituído por 0,5 % Bacto peptona, 0,5 % extrato de levedura, 0,5 % glucose, 0,1 % sulfato de magnésio heptahidratado.

### 3.2.3 Formulação do sumo com os microrganismos e fermentação

Ao sumo diluído previamente preparado adicionou-se a quantidade já especificada de fermento de padeiro e deixou-se fermentar até que os valores de °Brix estabilizassem. Durante a fermentação foram retiradas amostras de 5 mL para análise de °Brix e de pH e posterior análise de HPLC para estudar a evolução dos substratos e produtos da fermentação.

Antes de iniciar a fermentação acética, estudaram-se 3 processos: centrifugar o fermentado, autoclavar o fermentado e manter inalterado o fermentado proveniente da fermentação alcoólica. De seguida, de acordo com o inóculo escolhido, adicionou-se cerca de 10 % do volume total de vinagre não pasteurizado ou 20 mL de meio com a bactéria acética. Ao longo do tempo, foram retiradas amostras de 25 mL para análise de °Brix e de pH e posterior análise de HPLC para estudar a evolução dos substratos e produtos da fermentação e análise da acidez total.

Durante os vários ensaios, ambas as fermentações decorreram numa incubadora orbital (*IKA 4000i control*), a 30 °C e com uma agitação de 180 min<sup>min</sup>.

### 3.2.4 Determinação da acidez total

Para determinar a acidez total das amostras da fermentação acética recorreu-se à técnica de titulação ácido-base. O titulante usado foi uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L.

Mediram-se 5 mL de amostra que foi diluída em água destilada numa proporção 1:4 (v:v).

As análises foram feitas recorrendo ao programa *tiamo™ Metrohm* e aos equipamentos *902 Titrande Metrohm*, responsável por dispensar NaOH e ler os parâmetros recolhidos, e *801 Stirrer Metrohm*, responsável por manter a solução agitada e assim garantir que o titulante e o titulado se misturam. No programa o método já está pré-definido e para a titulação assim que atinge o ponto de viragem, informando depois o volume de titulante gasto.

Com o volume de titulante gasto é possível calcular o valor da acidez total recorrendo à Equação 1:

$$Acidez/\% = \frac{V_t \times 0,6004 \times M_{NaOH}}{V_a} \times 100 \quad \text{Equação 1} \quad [51]$$

Onde  $V_t$  corresponde ao volume de titulante gasto, em mililitros, calculado pela diferença entre o volume inicial e o volume final de titulante gasto e  $V_a$  ao volume de amostra de vinagre usado. O valor 0,6004 corresponde ao fator determinado a partir da massa molar do ácido acético e do número de hidrogénios ionizáveis e que permite obter o resultado em g de ácido acético/100 mL [51].

No Anexo B encontra-se o exemplo de cálculo.

### 3.3 Análise do pH e do °Brix

Para a leitura do °Brix usou-se um refratômetro (*HANNA Instruments HI-96801*) onde se leu uma amostra com um volume de 100 µL. Entre cada leitura, o equipamento foi lavado com água destilada.

Para a leitura do pH recorreu-se a um medidor de pH (*HANNA Instruments HI 2215 pH/ORP Meter*) onde a sonda foi mergulhada na amostra até cobrir o eletrodo e anotou-se o valor após este estabilizar. O eletrodo foi lavado com água destilada.

### 3.4 Análise dos açúcares e ácidos orgânicos por HPLC

De forma a estudar a evolução dos substratos e dos produtos das várias fermentações realizou-se análises de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) com detecção por índice de refração (IR) e ultravioleta (UV), cuja função é separar e quantificar compostos com base na forma como este reage com a fase móvel e a fase estacionária, conseguindo distinguir os vários compostos de uma amostra através do tempo de retenção de cada composto.

#### Preparação da fase móvel

A solução usada como fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) com uma concentração de 5 mmol/L preparada em água destilada.

O volume de fase móvel necessário para analisar as amostras recolhidas foi calculado pela Equação 2. Como o magneto que assegura que o tubo por onde entra a fase móvel no sistema tem de estar sempre coberto por solução, foi preparado sempre um volume de 150 mL de solução a mais.

$$V_{fm} = N_a^o Q t_c \quad \text{Equação 2}$$

Onde  $V_{fm}$  é o volume de fase móvel,  $N_a^o$  corresponde ao número total de amostras que se deseja analisar e  $t_c$  é o tempo necessário para obter os picos de todas as substâncias que pretendemos analisar.

A solução de fase de móvel foi filtrada usando um filtro *Millipore 100 µm Nylon Net, hydrophilic non-sterile*.

Antes de ser usada para as análises de HPLC foi desgaseificada.

#### Preparação das amostras

Como mencionado anteriormente, ao longo das fermentações foram recolhidas amostras para analisar o comportamento dos microrganismos e estudar o tempo ideal de fermentação. Antes de serem analisadas, todas essas amostras têm de ser preparadas para remover compostos que possam entupir a coluna do equipamento.

As amostras destinadas ao HPLC foram filtradas usando uma seringa acoplada a um filtro *FilterBio Pes Syring Filter 0,22 μm*, Figura 9. O líquido filtrado foi vertido para um *vial*, Figura 10, que foi congelado a -20 °C até ao dia das análises.



Figura 9: Filtro 0,22 μm PES usado na filtração das amostras de HPLC.



Figura 10: Vial usado para armazenar as amostras de HPLC.

### Curvas de calibração

Para ser possível determinar a concentração dos componentes das amostras a partir da área dos seus picos, bem como conhecer o seu tempo de retenção é necessário preparar amostras-padrão de concentração conhecida e amostras isoladas dos componentes a analisar, respetivamente.

A partir dos dados obtidos pelas amostras-padrão é possível obter uma curva de calibração com a concentração conhecida dos compostos em função da área do respetivo pico.

Devido a problemas no equipamento entre ensaios foi necessário usar dois equipamentos diferentes para analisar os compostos.

Na Tabela 4 estão apresentadas as concentrações das soluções-padrão usadas para cada composto para obter a curva de calibração no primeiro equipamento usado. Na Tabela 5: Concentrações dos respetivos compostos analisados usados para obter a segunda curva de calibração estão apresentadas as concentrações das soluções-padrão usadas para cada composto para obter a curva de calibração no segundo equipamento usado.

No Anexo C estão representadas as curvas de calibração obtidas e os limites de deteção e de quantificação de cada método. O limite de deteção exprime a quantidade de analito que o método é capaz de detetar sem quantificar, o limite de quantificação representa a quantidade de analito que o método é capaz de quantificar com precisão. Estes valores foram obtidos com base nas Normas da Comissão Europeia utilizando o método de estimação por calibração [52].

Tabela 4: Concentrações dos respetivos compostos analisados usados para obter a primeira curva de calibração

Composto	Concentração (g/L)					
	1	2	3	4	5	6
Sacarose	10	5	2,5	1,25	0,625	0,31
Glucose	10	5	2,5	1,25	0,625	0,31
Frutose	10	5	2,5	1,25	0,625	0,31
Etanol	40	20	10	5	2,5	1,25
Ácido cítrico	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Ácido láctico	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Ácido acético	4	2	1	0,5	0,25	0,125

Tabela 5: Concentrações dos respetivos compostos analisados usados para obter a segunda curva de calibração

Composto	Concentração (g/L)			
	1	2	3	4
Sacarose	80	20	5	1,25
Glucose	80	20	5	1,25
Frutose	80	20	5	1,25
Etanol	80	20	5	1,25
Ácido cítrico	40	10	2,5	0,625
Ácido láctico	40	10	2,5	0,625
Ácido acético	40	10	2,5	0,625

## HPLC

As amostras recolhidas durante as fermentações, bem como as soluções-padrão foram analisadas por HPLC. A coluna usada em ambos os equipamentos foi a coluna *Aminex HPX-87P Column*.

A quantidade de amostra analisada foi de 10  $\mu$ L. O tempo de corrida escolhido foi de 25 min para garantir a análise de todos os compostos que se pretendia analisar. De forma a não prejudicar nenhum composto, a temperatura da coluna foi de 25 °C e o caudal de fase móvel foi de 0,5 mL/min. Estes parâmetros foram usados para ambos os equipamentos.

### 3.5 Análise sensorial

Os sumos finais do quarto ensaio foram analisados por 30 provadores inexperientes pertencentes a faixas etárias aleatórias.

A cada provador foi entregue uma amostra de sumo fermentado, bem como uma amostra de sumo não fermentado da mesma variedade de maçã, tratado pelas mesmas condições que o sumo fermentado

(centrifugado, filtrado, corrigido o °Brix e autoclavado), bem como uma garrafa de água. Entre cada prova, o provador teve de preencher um questionário referente a cada amostra. O questionário pode ser consultado no Anexo D.

## 4 Resultados e discussão

Para combater o desperdício de fruta que não pode ser vendida, foi sugerida a produção de um sumo probiótico e de vinagre de maçã. A escolha das variedades de maçã foi limitada ao *stock* existente nos vários supermercados onde a fruta foi adquirida, pelo que foi escolhido trabalhar essencialmente com três variedades de maçã (Royal Gala, Fuji e Golden Delicious), tendo também sido estudada maçã Granny Smith, para a formulação dos sumos e com maçã da variedade Golden Delicious para a formulação do vinagre.

### 4.1 Sumo

Foram realizados quatro ensaios de fermentação láctica onde foi inoculado sumo de maçã com *Lactocaseibacillus casei*. No primeiro ensaio foram estudadas as condições de fermentação, bem como qual o intervalo de tempo para retirar amostras. Nos ensaios seguintes foi estudado o comportamento da bactéria nos sumos feitos a partir das variedades de maçã mais consumidas.

#### 4.1.1 Ensaio preliminar (1º ensaio)

Num primeiro passo estudou-se a fermentação láctica num sumo de maçã simples independente da variedade de maçã.

Começou-se por retirar amostras de hora a hora, mas como não havia alterações significativas entre os valores, optou-se por retirar amostras de 24 em 24 horas.

Na Figura 11 e na Figura 12 estão representadas a evolução dos valores de °Brix, e de pH.

O °Brix inicial foi de 8,1 e foi aumentando até atingir um valor de 8,6. Em contrapartida, o pH começou em 3,91 e foi descendendo ligeiramente até atingir 3,86.

De forma a estudar o desenvolvimento da bactéria foi lida a absorbância do produto ao longo do tempo. A partir da análise da Figura 13 é possível ver que apesar de inicialmente a bactéria não se estar a desenvolver como pretendido, a partir do quarto dia, apresenta algum desenvolvimento. Isto pode ter acontecido uma vez que a bactéria, após ser inoculada num novo meio, passa por um período de adaptação e só no fim desse período começa a desenvolver-se. O período de adaptação pode ter ocorrido até ao terceiro dia, onde houve perda de bactérias por inadaptação ao meio.

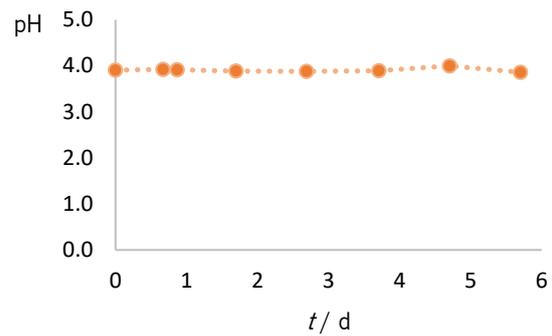
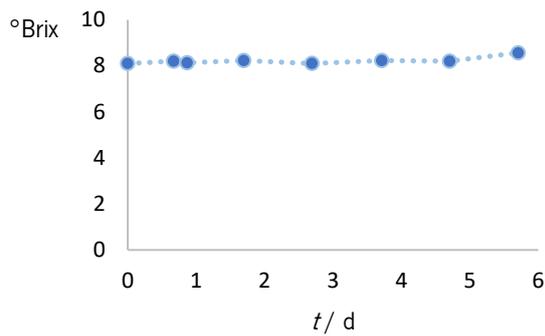


Figura 11: Evolução do °Brix em função do tempo para o 1º ensaio.

Figura 12: Evolução do pH em função do tempo para o 1º ensaio.

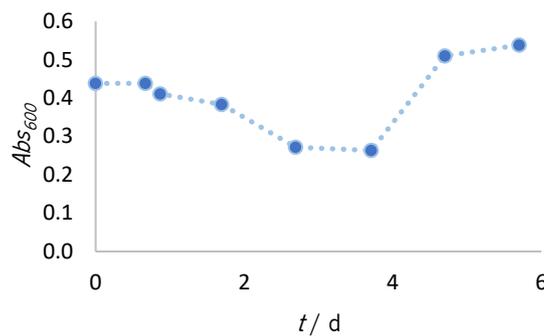


Figura 13: Absorvância lida a 600 nm para as amostras do 1º ensaio.

#### 4.1.2 Fermentações simples (2º e 3º ensaios)

Nos ensaios a seguir apresentados foi estudado o comportamento da bactéria láctica em quatro sumos de maçã diferente sem a adição de componentes extra: três sumos do segundo ensaio (variedades Royal Gala, Fuji e Golden Delicious) e um do terceiro (Granny Smith).

#### Evolução do °Brix e do pH

Na Figura 14 e na Figura 15 está representada a variação do °Brix e do pH ao longo dos respectivos ensaios.

Para os ensaios com Maçã Royal Gala, Fuji e Golden Delicious o °Brix foi corrigido para 10 enquanto no ensaio com maçã Granny Smith o °Brix foi corrigido para 8.

As quatro fermentações decorreram durante 9 dias a 30 °C. Através da análise dos gráficos é possível ver que ao longo desse período o valor do °Brix manteve-se constante, exceto no caso da maçã Granny Smith (Figura 14.D) onde é possível ver uma ligeira diminuição.

No caso do pH é possível ver três tendências: na maçã Golden Delicious onde se percebe um ligeiro aumento no valor (Figura 15.B2); uma ligeira diminuição no caso da maçã Fuji (Figura 15.A2) e na maçã

Granny Smith (Figura 15.D2); e uma diminuição ligeira seguido de um aumento na maçã Royal Gala (Figura 15.C2). Os sumos das variedades Fuji, Royal Gala e Golden Delicious iniciaram a fermentação com um pH perto de 4,00 (4,12; 3,62 e 3,90, respetivamente), enquanto o sumo de Granny Smith iniciou a fermentação com pH de 3,30.

A diminuição do pH indica uma maior acidez do meio ao longo do tempo, que pode estar associada à produção de ácido láctico. Esta produção de ácido láctico estaria associada a um consumo de açúcares, que estaria representada na diminuição do °Brix. Comparando os quatro pares de imagens (evolução do °Brix e do pH para os quatro sumos), verifica-se que onde ocorre diminuição de um, também se pode observar uma alteração no outro, por mais ligeira que seja.

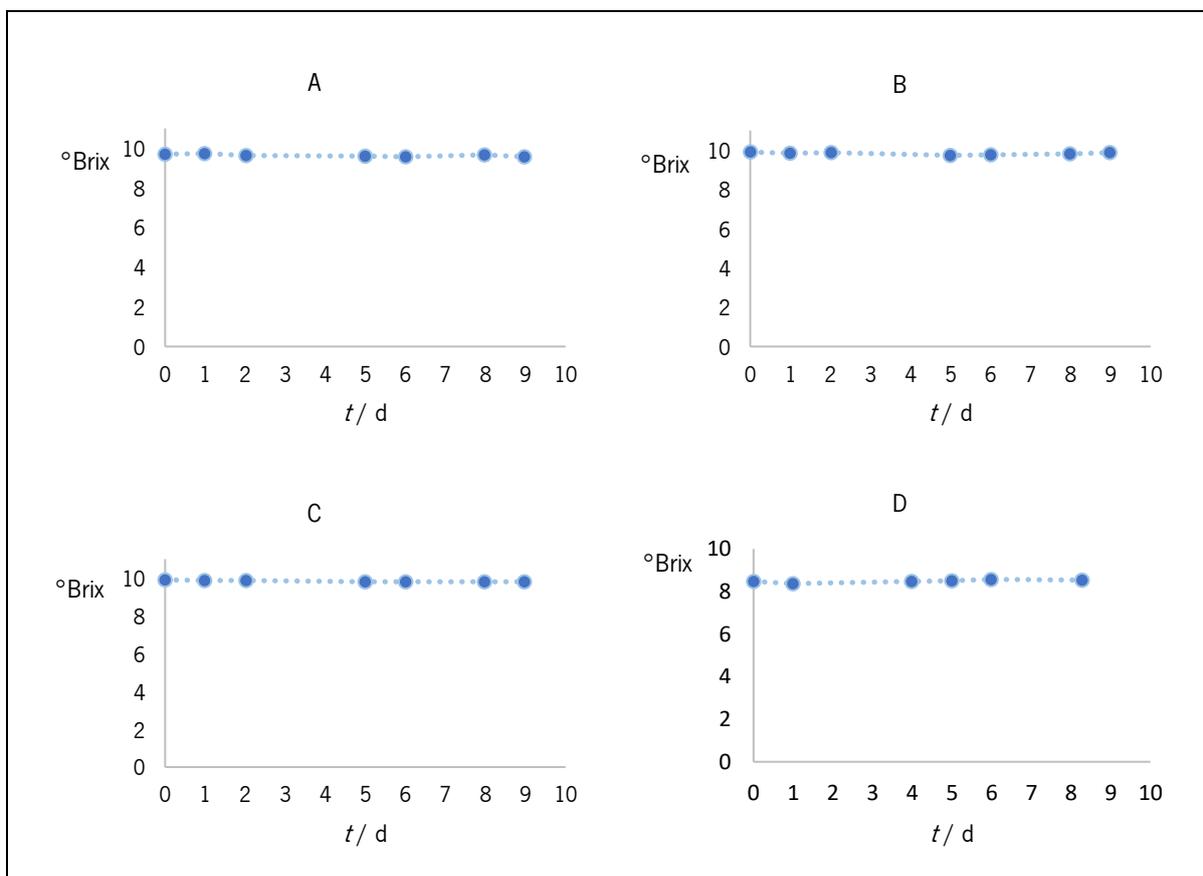


Figura 14: Evolução do °Brix ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B), Royal Gala (C) e Granny Smith (D) onde não foi adicionados componentes extra.

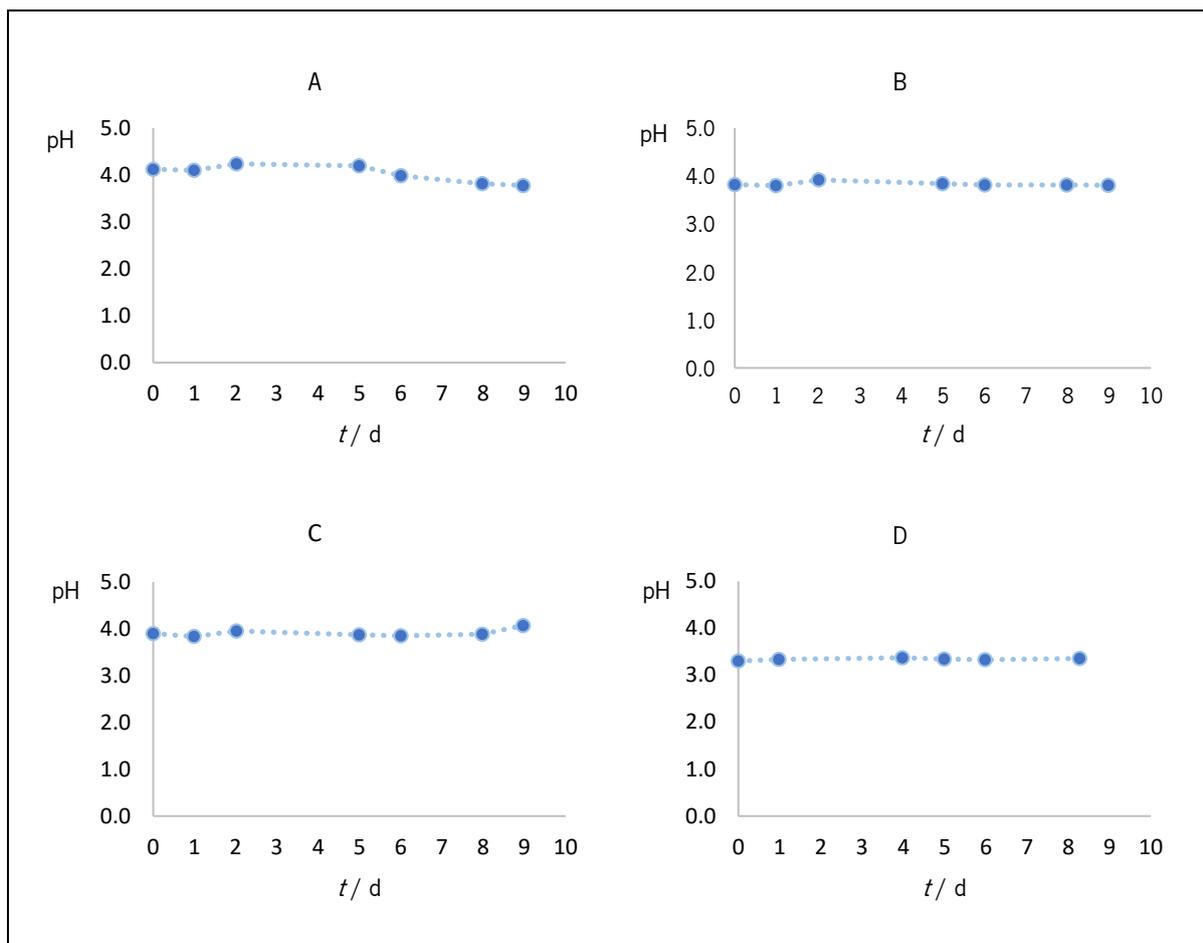


Figura 15: Evolução do pH ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B), Royal Gala (C) e Granny Smith (D) onde não foi adicionados componentes extra.

### Desenvolvimento da bactéria *Lacticaseibacillus casei*

O desenvolvimento da bactéria foi estudado por absorvância a 600 nm. Na Figura 16 é possível ver a evolução da absorvância nos vários sumos.

Pela análise da Figura 16 é possível ver que três das quatro variedades apresentam um crescimento positivo ao longo do tempo. Pela Figura 16.A é possível ver que a bactéria teve um grande desenvolvimento no sumo da variedade Fuji, o mesmo aconteceu na maçã da variedade Royal Gala, representado na Figura 16.C. No sumo de maçã Golden Delicious houve um crescimento favorável da bactéria, no entanto muito menor do que nos dois sumos anteriormente mencionados, Figura 16.B. Na Figura 16.D é possível ver um ligeiro padrão de crescimento nos dias 0, 1, 4, 6 e 8 (representado pelo triângulo), nos restantes dias pode ter havido um erro na recolha da amostra, uma vez que parte da amostra era filtrada para as análises por HPLC, a parte da amostra destinada ao espectrofotómetro pode ter resultado da amostra filtrada.

Nos diferentes sumos verifica-se que a bactéria se desenvolveu de forma diferente, demorando mais ou menos tempo a adaptar-se. Isto pode estar relacionado com as diferenças na composição dos sumos que afetaram o desenvolvimento das bactérias.

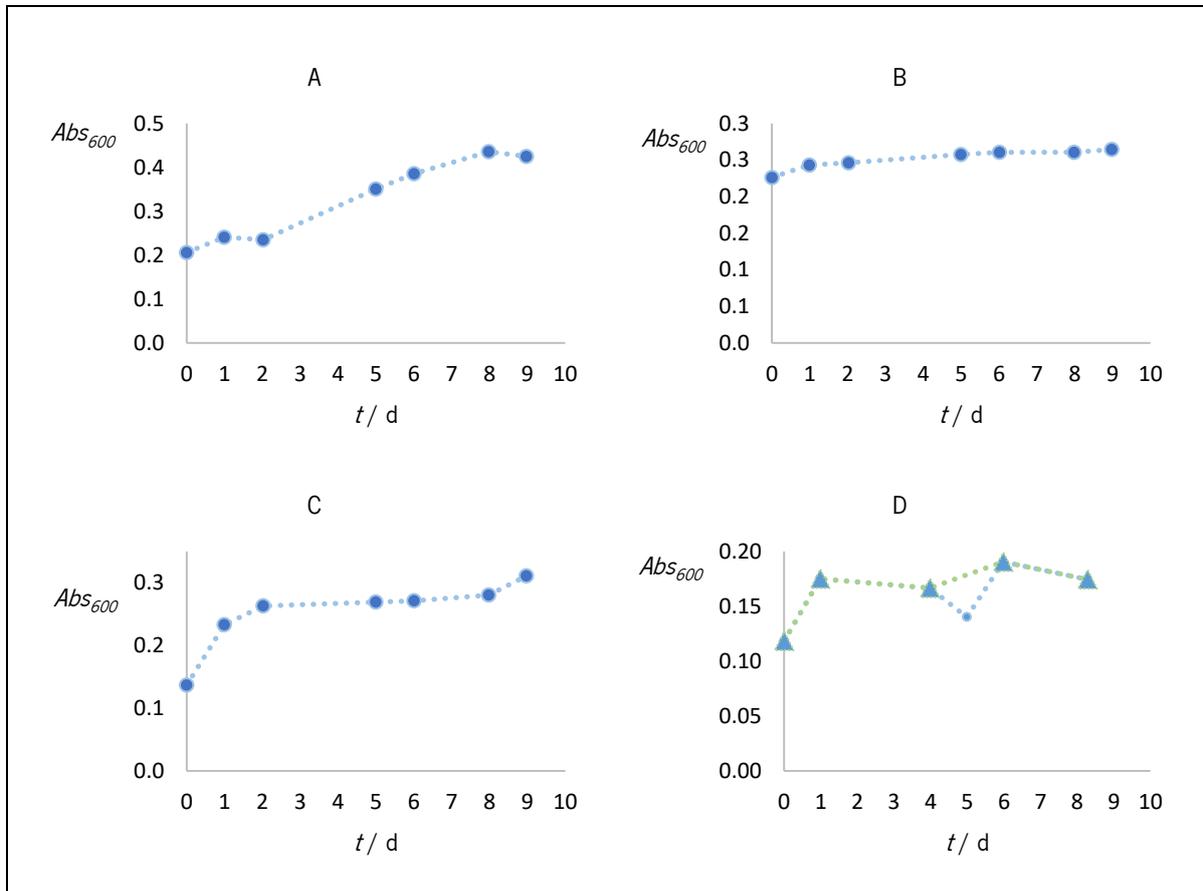


Figura 16: Evolução da absorbância a 600 nm ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B), Royal Gala (C) e Granny Smith (D) onde não foi adicionados componentes extra.

Em meio propício a tal, as bactérias têm um crescimento bacteriano semelhante a uma curva exponencial, comparando a Figura 8 e a Figura 16 é possível ver que nas variedades Fuji e Royal Gala essa curva está bastante explícita, na curva do sumo de maçã Golden Delicious a curva não é tão acentuada e no sumo da maçã Granny Smith seguindo os pontos representados por triângulos é possível ver uma tendência exponencial.

### Teor de ácidos e açúcares

De forma a estudar as várias fermentações de forma mais aprofundada, estudou-se o consumo dos açúcares e a formação de ácido láctico. Um dos objetivos do sumo é este não possuir teor alcoólico, pelo que se estudou também a presença ou ausência de etanol no sumo.

Na Figura 17 está representada a evolução dos consumos dos açúcares e da formação de ácido láctico.

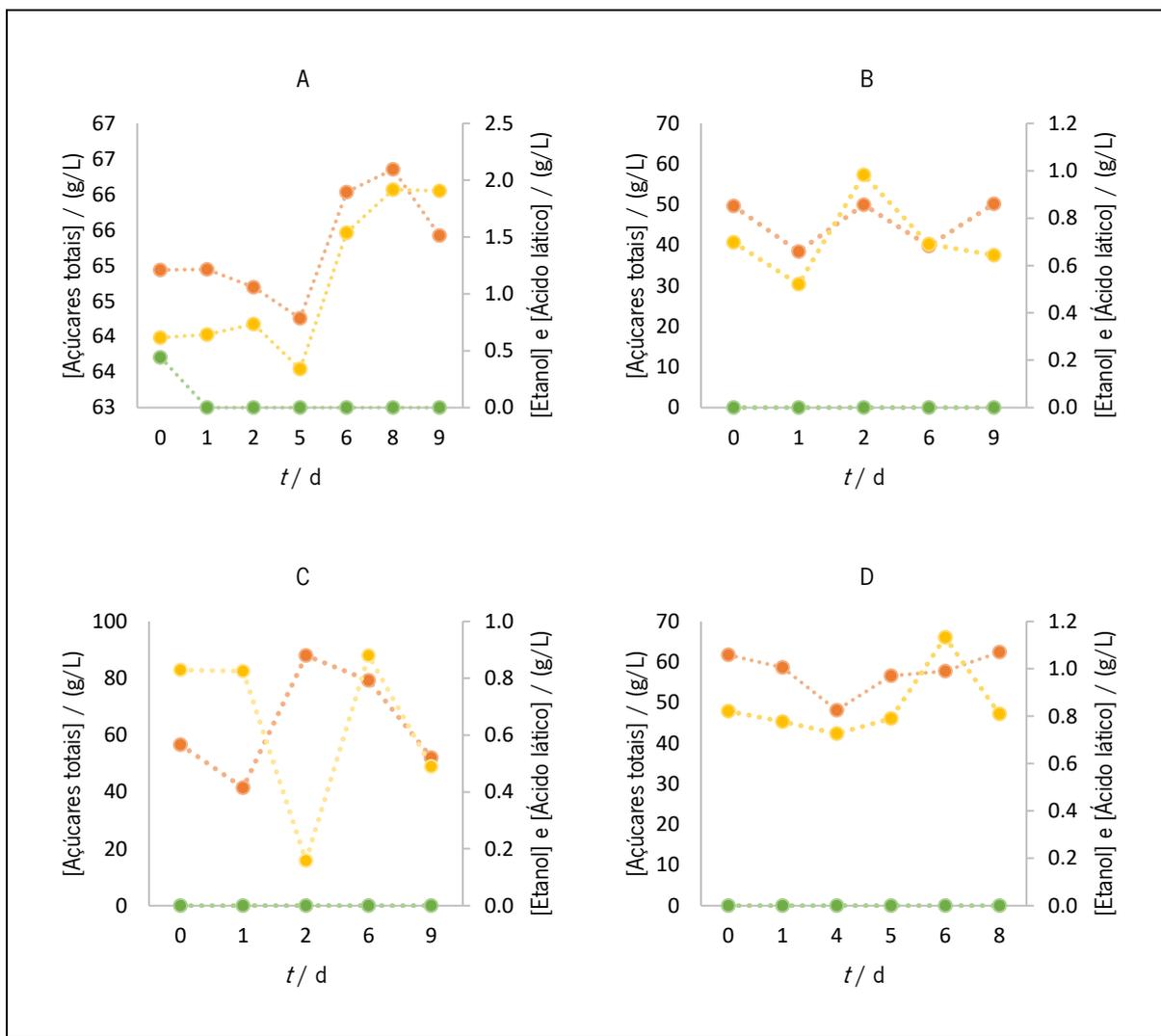


Figura 17: Evolução da fermentação ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B), Royal Gala (C) e Granny Smith (D) onde não foi adicionados componentes extra: —●— [Açúcares totais] (g/L); —▲— [Etanol] (g/L); —◆— [Ácido láctico] (g/L).

Para os sumos com °Brix equivalente a 10, os sumos de maçã Fuji, Golden Delicious e Royal Gala iniciaram a fermentação com cerca de 65, 50 e 35 g/L de açúcares totais. O sumo que iniciou a fermentação com °Brix equivalente a 8,5, o sumo da maçã Granny Smith, iniciou a fermentação com cerca de 60 g/L de açúcares totais. Esta inconsistência nos valores de °Brix comparativamente aos valores de açúcares totais pode estar relacionada com o facto de que o °Brix representa não só a presença dos açúcares nos sumos, mas também a presença de outros compostos que variam de variedade para variedade de maçã, com a diluição do sumo e com a fase de maturação dos frutos.

Pela análise dos gráficos é possível ver que no caso do sumo de Fuji não houve variação do consumo dos açúcares, correspondendo ao que foi analisado na evolução do °Brix (Figura 14.1). Por outro lado, nos sumos de Golden Delicious, Royal Gala e Granny Smith, em certos dias, a evolução do consumo dos açúcares mantém-se semelhante à evolução do °Brix (dias 0, 2 e 9; 0, 1 e 9 e 0, 1, 5, 6 e 8, respetivamente).

Comparando a formação de ácido láctico com a evolução do pH ao longo do tempo nos vários sumos, é possível ver que no caso da maçã Fuji, o pH tem uma alteração mais notável e, igualmente, há uma maior formação de ácido láctico. Nos outros três sumos, não há uma grande variação de pH nem uma formação de ácido láctico tão relevante. No sumo de maçã Fuji, a concentração máxima de ácido láctico ocorreu no nono dia, correspondendo a uma concentração de 1,91 g/L, no sumo de maçã Royal Gala, a concentração máxima de ácido láctico ocorreu no sexto dia, correspondendo a 0,88 g/L, no sumo de maçã Golden Delicious, a concentração máxima de ácido láctico ocorreu no segundo dia, correspondendo a uma concentração de 0,98 g/L e no sumo de maçã Granny Smith, a concentração máxima de ácido láctico ocorreu no sexto dia, correspondendo a uma concentração de 1,13 g/L.

Em nenhum sumo foi registada a presença de etanol, registando-se uma concentração constante de 0 g/L.

#### 4.1.3 Fermentação com adição de extrato de levedura (4º ensaio)

Nos ensaios seguintes foi estudado o comportamento da bactéria láctica nos sumos de Maçã Fuji, Royal Gala e Golden Delicious com a adição de extrato de levedura. O extrato de levedura foi adicionado para estimular o crescimento da bactéria uma vez que é uma fonte de azoto e macronutrientes, de forma a verificar se, na presença deste composto, a bactéria aumentava a produção de ácido láctico, enquanto se desenvolvia melhor.

#### **Evolução do °Brix e do pH**

Na Figura 18 está representada a variação do °Brix e na Figura 19 do pH para os diferentes ensaios.

As três fermentações decorreram ao longo de 9 dias a 30 °C. O °Brix de todas as fermentações foi corrigido para 7 e o pH inicial foi de 3,80.

A evolução do °Brix nos três ensaios foi mais notável do que nos ensaios onde não ocorreu adição de extrato de levedura, havendo neste caso uma diminuição maior nos valores de °Brix, tendo atingido um valor final de 6,9 nos três ensaios.

No caso do pH é possível ver que as três fermentações tiveram evoluções semelhantes, a partir do primeiro dia o pH foi sempre em decréscimo, até atingir um valor final de cerca de 3,20 nas três fermentações (3,23, 3,21 e 3,18 respetivamente para os sumos de maçã Fuji, Golden Delicious e Royal Gala).

Isto pode ter ocorrido uma vez que na presença de extrato de levedura, a bactéria desenvolveu-se melhor e consumiu mais açúcares, resultando também numa maior produção de ácido láctico que acidificou o meio, causando assim, a diminuição do pH.

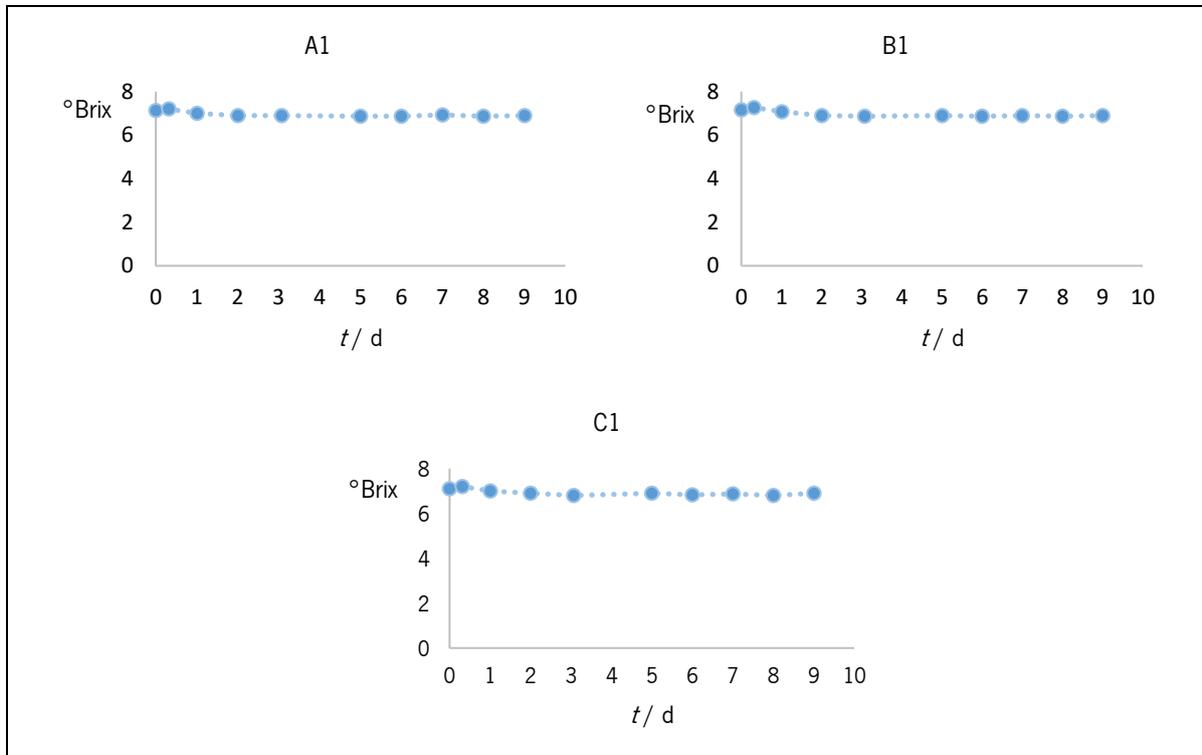


Figura 18: Evolução do °Brix ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B) e Royal Gala (C) onde foi adicionado extrato de levedura.

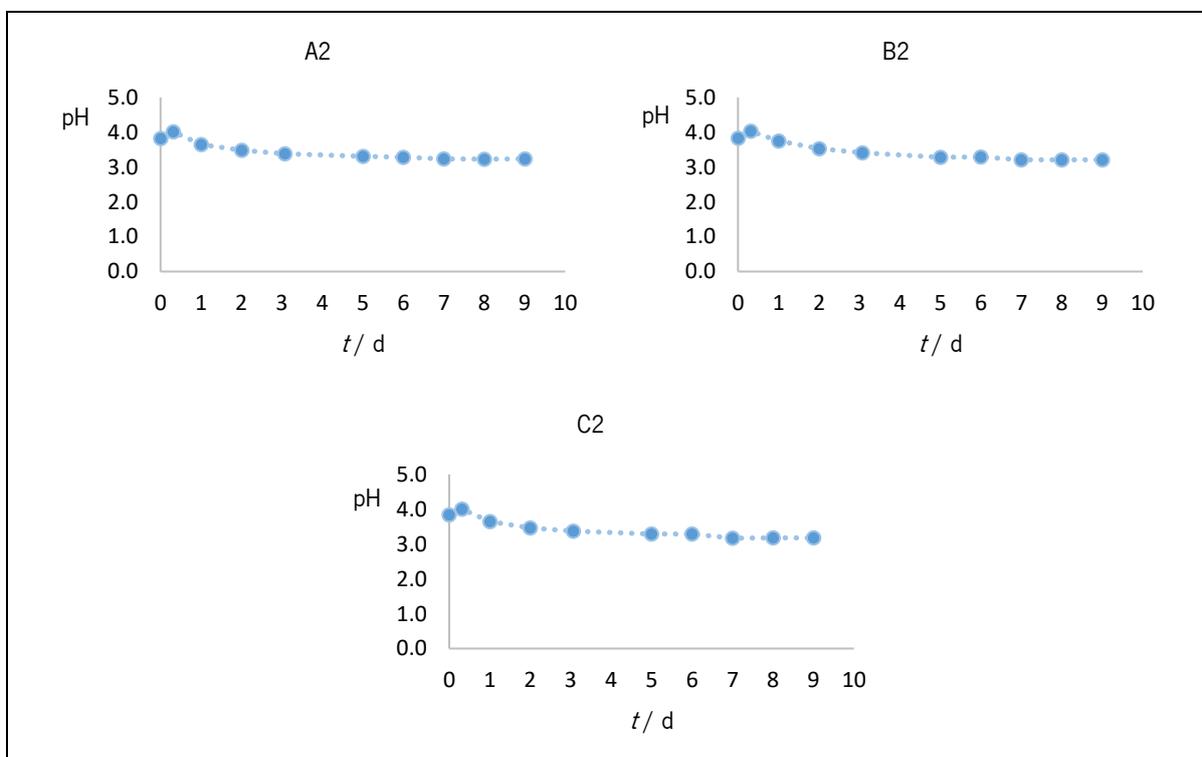


Figura 19: Evolução do pH ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B) e Royal Gala (C) onde foi adicionado extrato de levedura.

### Desenvolvimento do *Lacticaseibacillus casei*

Para estes ensaios, o desenvolvimento da bactéria também foi estudado por refratometria a 600 nm. Na Figura 20 é possível ver a evolução da absorbância nos vários sumos.

Pela análise da Figura 20 é possível ver que nos três sumos, a bactéria teve um crescimento positivo ao longo do tempo.

Comparando a Figura 8 e a Figura 20 verifica-se que nos três sumos houve um crescimento semelhante ao esperado, não sendo tão explícito no caso do sumo de maçã Fuji (Figura 20.A).

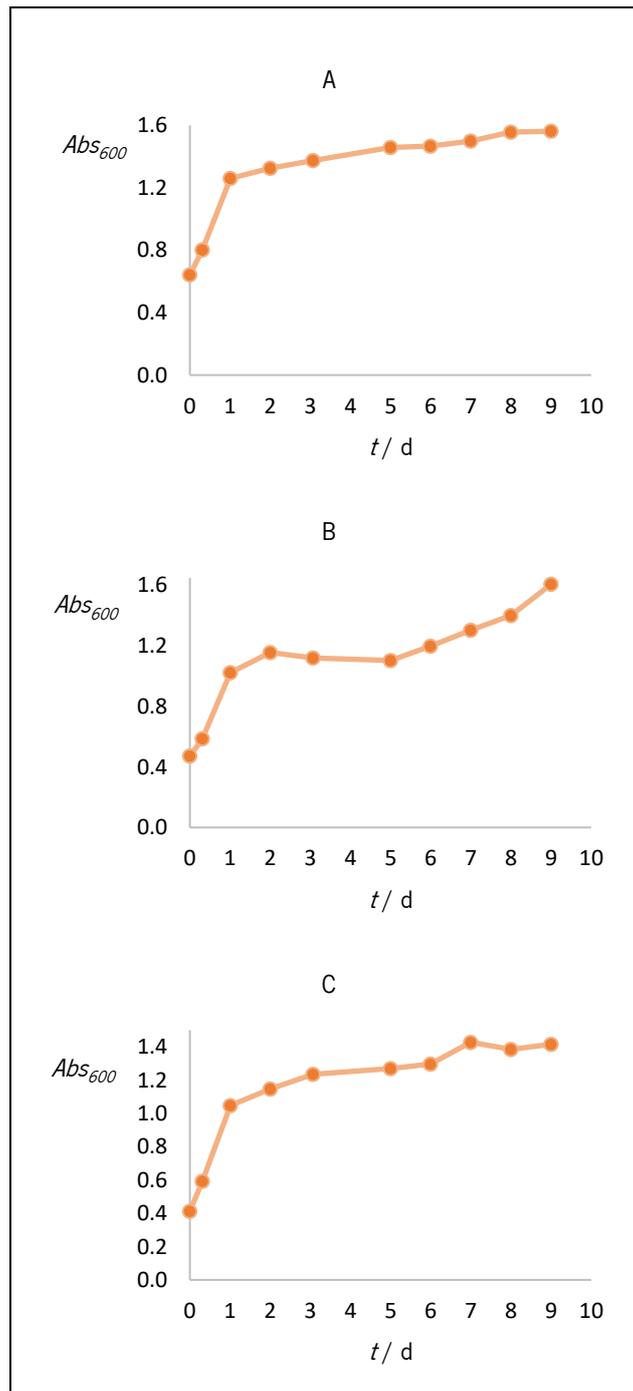


Figura 20: Evolução da absorbância a 600 nm ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B) e Royal Gala (C) onde foi adicionado extrato de levedura.

## Teor de ácidos e açúcares

De igual forma, para estudar as várias fermentações de forma mais aprofundada, estudou-se o consumo dos açúcares e a formação de ácido láctico; também foi estudada a presença ou ausência de etanol no sumo.

Na Figura 21 está representada a evolução dos consumos dos açúcares e da formação de ácido láctico.

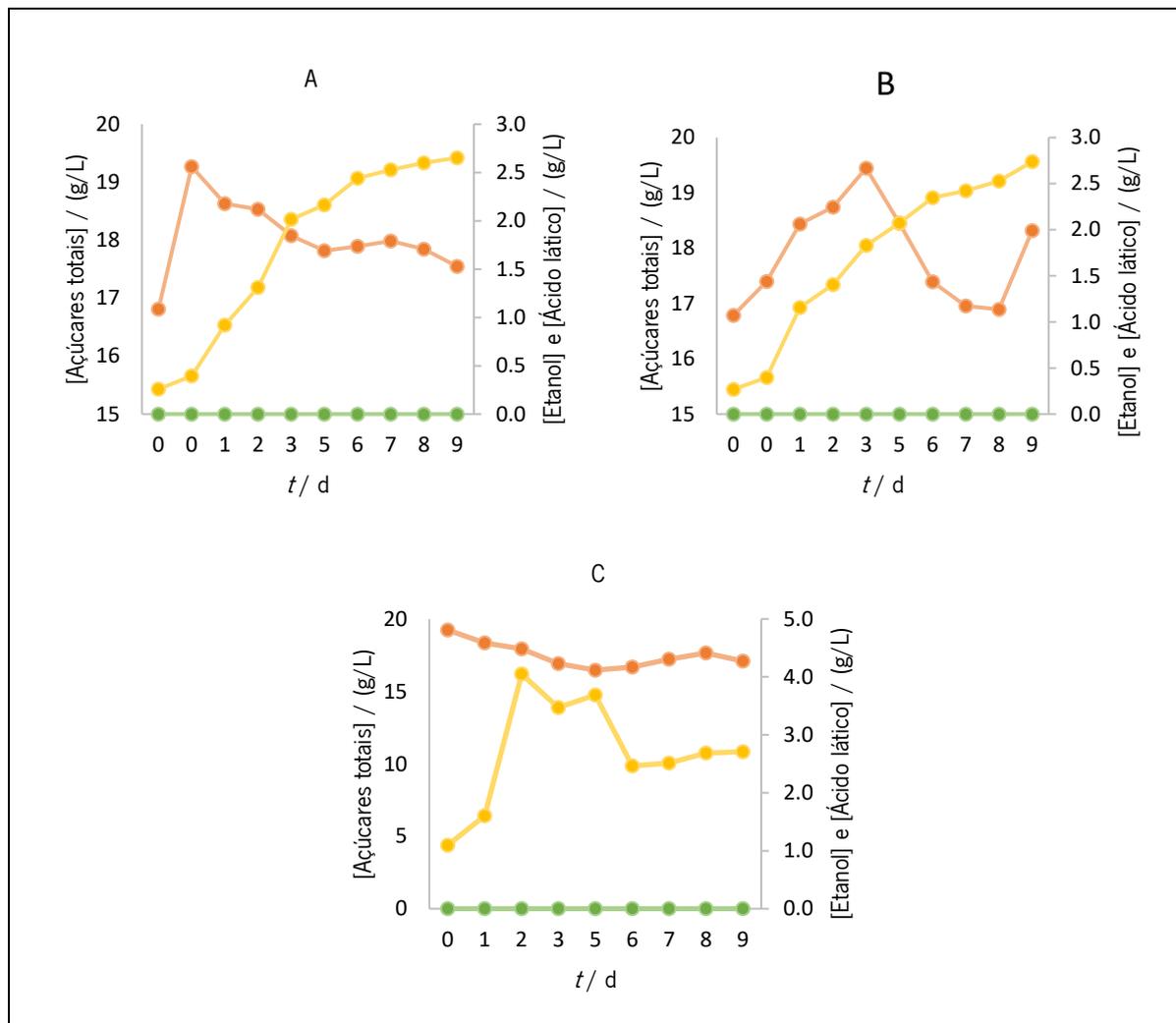


Figura 21: Evolução da fermentação ao longo do tempo para os sumos das variedades de maçã Fuji (A), Golden Delicious (B) e Royal Gala (C) onde foi adicionado extrato de levedura. — [Açúcares totais] (g/L); — [Etanol] (g/L); — [Ácido láctico] (g/L).

Quando comparado com os valores de concentrações obtidos anteriormente, estes valores são muito inferiores. Isto pode resultar de erros ao criar a curva de calibração de um dos métodos que resulta numa discrepância tão grande entre as concentrações dos compostos quando os valores de pH e de °Brix entrem ensaios não é tão discrepante.

O °Brix inicial dos três sumos foi de 7 e a concentração de açúcares totais no início da fermentação foi diferente nos três sumos, 16,81 g/L no sumo de maçã Fuji, 16,74 g/L no sumo de maçã Golden Delicious e 19,24 g/L no sumo de maçã Royal Gala. Não é possível comparar estes valores com os valores dos sumos das maçãs onde não foi adicionado extrato de levedura, uma vez que estes valores

de concentração são bastante inferiores aos outros. Ambos os sumos foram feitos com diferentes maçãs compradas com um mês de diferença, o que pode alterar as características nutricionais entre maçãs, pelo tempo de maturação após a colheita, pelo tratamento que as maçãs levaram e pelo armazenamento. Seria necessário reavaliar as amostras e obter nova curva de calibração.

Pela análise dos gráficos é possível ver que nos três sumos ocorreu um consumo de açúcar diferente: no caso do sumo de maçã Fuji, a partir do primeiro dia, a quantidade de açúcares totais foi diminuindo até ao fim da fermentação; no caso do sumo de maçã Golden Delicious a concentração dos açúcares totais foi variando ao longo dos dias, no entanto, se excluirmos o valor do nono dia, percebemos uma diminuição nos valores a partir do terceiro dia. Por outro lado, no sumo de maçã Royal Gala, os açúcares foram consumidos até ao sexto dia e a partir, daí a concentração voltou a crescer. Esta alteração da concentração dos açúcares totais pode ser explicada pelo facto de que a bactéria consome primeiro a frutose, seguida da glucose e depois hidrolisa a sacarose em frutose e glucose, o que resulta numa diminuição da concentração de sacarose e simultaneamente um aumento de frutose e glucose [53].

Comparando a formação de ácido láctico com a evolução do pH ao longo do tempo nos vários sumos, é possível ver que em todos os sumos houve uma formação semelhante de ácido láctico, assim como um decréscimo semelhante de pH. No sumo de maçã Fuji, a concentração máxima de ácido láctico ocorreu no nono dia, correspondendo a uma concentração de 2,65 g/L; no sumo de maçã Royal Gala, a concentração máxima de ácido láctico ocorreu no segundo dia, correspondendo a uma concentração de 4,05 g/L, tendo depois baixado até ao sexto dia, onde atingiu uma concentração de 2,47 g/L e voltou a subir até atingir uma concentração de final de 2,70 g/L e no sumo de maçã Golden Delicious, a concentração máxima de ácido láctico ocorreu no nono dia, correspondendo a uma concentração de 2,73 g/L.

De novo não foi registada a presença de etanol, obtendo, assim, em todos os sumos uma concentração constante de 0 g/L.

Comparando os resultados dos vários ensaios, verifica-se que onde foi obtida uma maior produção de ácido láctico foi na fermentação onde foi adicionado o extrato de levedura. De igual forma, a bactéria desenvolveu-se melhor nos sumos da última fermentação. Uma maior concentração de ácido láctico em meio com extrato de levedura comparativamente a meio simples, também ocorreu noutro estudo, foi usada a mesma bactéria (*Lactocaseibacillus casei*) porém foi usado outro meio (puré de banana) onde o meio com extrato obteve uma produção de ácido láctico de cerca de 2,5 % (p/v), enquanto o meio não enriquecido apenas obteve 0,5 % (p/v) [53].

#### 4.1.4 Análise sensorial

No fim do quarto ensaio foram realizadas provas sensoriais onde foram comparados os sumos resultantes do quarto ensaio com sumos não fermentados obtidos dos mesmos lotes de maçã.

Para tal prepararam-se sumos de maçã com as mesmas variedades, ou seja, sumo de maçã das variedades Fuji, Golden Delicious e Royal Gala, mas que não foram fermentados: foram centrifugados, filtrados, autoclavados mas não lhes foi adicionado inóculo da bactéria, nem extrato de levedura.

Os resultados obtidos nas provas encontram-se no Anexo E.

Nas Figura 22, Figura 23 e Figura 24 estão representados os resultados médios obtidos nas provas sensoriais realizadas pelos 30 provadores.

No caso da maçã Fuji, os provadores consideraram que o sumo não fermentado possuía melhor pontuação em todos os aspetos, inclusive que se sentia menor sabor acético. A nível de apreciação global, doçura e sabor, os provadores demonstraram que o sumo não fermentado encaixava-se melhor no seu paladar e gosto.

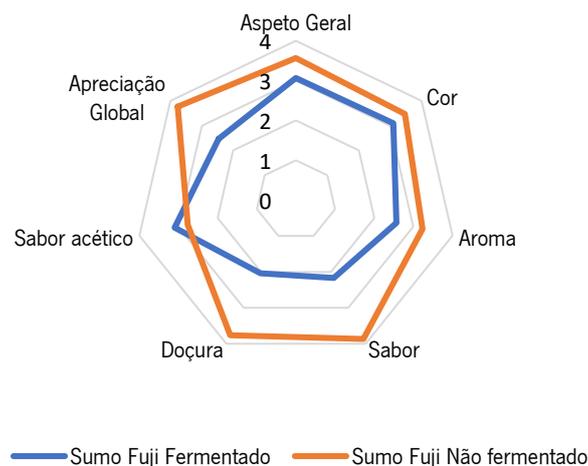


Figura 22: Resultados médios da prova sensorial do sumo de maçã da variedade Fuji.

No caso dos sumos da variedade Golden Delicious, apesar do sumo não fermentado apresentar apreciação muito superior a nível global, da doçura e do sabor, nos restantes parâmetros, a pontuação dos dois sumos é mais próxima, sendo que a nível do sabor acético ambos os sumos são equiparáveis. A nível do aspeto geral e da cor, o sumo fermentado demonstrou ser mais apreciado por parte dos provadores.

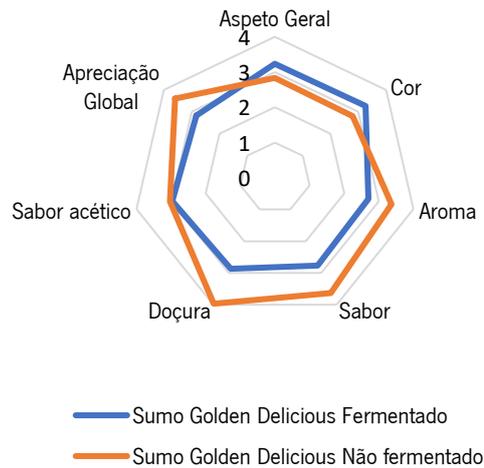


Figura 23: Resultados médios da prova sensorial do sumo de maçã da variedade Golden Delicious.

No caso dos sumos da variedade Royal Gala, o sumo não fermentado foi o preferido entre os dois. Em todos os parâmetros obteve melhor pontuação: no caso da doçura, sabor, aroma e apreciação global, a diferença entre os dois sumos é notável. A nível da cor e do aspeto geral, os dois sumos obtiveram pontuações próximas uma da outra e a nível do sabor acético, o sumo fermentado foi caracterizado como melhor.

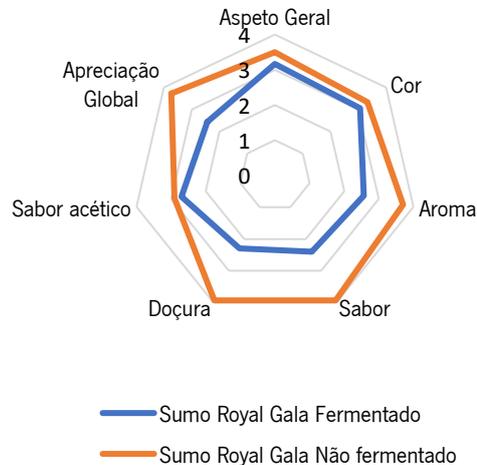


Figura 24: Resultados médios da prova sensorial do sumo de maçã da variedade Royal Gala.

Comparando os resultados obtidos para os três sumos fermentados com os dados obtidos por *HPLC* verifica-se que no fim da fermentação o sumo da maçã Golden Delicious tem uma maior quantidade de açúcares (18,32 g/L) comparativamente aos sumos Fuji e Royal Gala (17,55 e 17,09 g/L, respetivamente). Por outro lado, o sumo da maçã Golden Delicious tem uma concentração de ácido láctico de 2,74 g/L, superior à concentração de ácido láctico dos sumos Fuji e Royal Gala 2,65 e 2,71 g/L, respetivamente. No entanto, dos três sumos, o que os provadores consideraram com um sabor mais

acético foi o sumo Fuji, o sumo com menor concentração de ácido láctico, estando o sumo Golden Delicious após este último. Entre os três sumos fermentados, o que interessou mais aos provadores testados, foi o sumo de maçã Golden Delicious, obtendo melhor resultado para todos os parâmetros exceto Acidez/Ácido acético.

## 4.2 Vinagre

Tal como foi dito anteriormente, para a produção de vinagre estudou-se o tipo de inóculo da fermentação acética (vinagre não pasteurizado e bactéria *Acetobacter syzygii*), bem como o procedimento efetuado entre fermentações (centrifugação, não centrifugação e autoclavagem).

Os primeiros três ensaios foram inoculados com vinagre não pasteurizado para a fermentação acética, tendo alterado o procedimento entre fermentações: no primeiro ensaio, no fim da fermentação alcoólica o fermentado obtido foi centrifugado, no segundo ensaio, após a fermentação alcoólica, o fermentado foi autoclavado, mas não foi centrifugado e no terceiro ensaio, o fermentado obtido da fermentação alcoólica não foi autoclavado nem centrifugado. No quarto ensaio, depois da fermentação alcoólica, o fermentado obtido foi centrifugado e inoculado com *Acetobacter syzygii* para a fermentação acética.

### 4.2.1 Evolução do °Brix e do pH

Ao longo das várias fermentações dos diferentes ensaios, o pH e o °Brix, foram estudados como forma de avaliar a evolução da fermentação.

#### Fermentação alcoólica

Na Figura 25 está representada a variação do °Brix e na Figura 26 a evolução do pH para os diferentes ensaios ao longo da fermentação alcoólica.

A fermentação alcoólica decorreu até haver estabilização do valor de °Brix.

Nos quatro ensaios o °Brix inicial foi corrigido para 10, tendo o primeiro ensaio iniciado em 9,7, o segundo em 9,8, o terceiro em 10,4 e o quarto ensaio em 9,9. Seria de esperar que a evolução do °Brix fosse semelhante nos quatro ensaios, no entanto, pela análise da Figura 25 é possível ver que tal não ocorreu: os quatro ensaios, com o mesmo inóculo e sob as mesmas condições tiveram tempo de estabilização diferentes: o primeiro e o segundo ensaio demoraram 2 dias até estabilizar, tendo a fermentação em si demorado 2,5 e 5 dias, respetivamente, o terceiro ensaio estabilizou no quarto dia e o quarto ensaio estabilizou ao fim de 1 dia. O tempo de fermentação do segundo e do terceiro ensaio durou mais tempo pois apanhou o fim-de-semana. Estas evoluções diferentes ao longo do tempo podem

ter decorrido das diferenças da composição dos sumos, diferindo na quantidade de glucose, que é a principal fonte de carbono usada pela levedura, [54]. A saturação do meio também pode explicar o maior tempo até estabilizar, uma vez que embora tenha preferência pela glucose, a levedura vai tentar transformar todo o substrato presente em etanol e pela análise da Figura 25 é possível ver que a fermentação que iniciou com °Brix superior a 10 foi a que demorou mais tempo a estabilizar.

As quatro fermentações acabaram com um °Brix de 3,6, 2,5, 5,1 e 2,9, respetivamente.

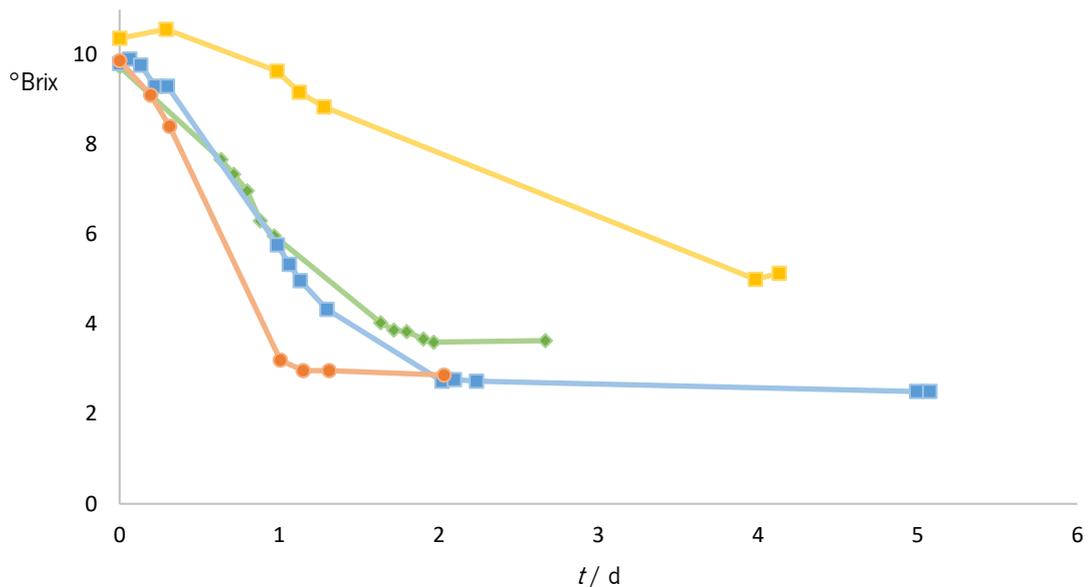


Figura 25: Evolução do °Brix durante as várias fermentações alcoólicas ao longo do tempo: ◆ - vinagre do 1º ensaio; ■ - vinagre do 2º ensaio; ■ - vinagre do 3º ensaio; ● - vinagre do 4º ensaio.

Por outro lado, pela Figura 26, é possível ver que os quatro ensaios tiveram uma evolução semelhante. O primeiro ensaio iniciou-se com um pH de 4,68, os restantes ensaios iniciaram-se com um pH de 4,05, 4,00 e 3,94, respetivamente. Ao longo do tempo o pH das fermentações foi diminuindo até atingir os valores 3,94, 3,87, 3,67 e 3,60. No entanto, é possível reparar que em certo momento da fermentação, o pH aumenta e volta a baixar até estabilizar. A diminuição do pH está relacionada com a libertação de iões  $H^+$ , que consoante alguns compostos vão sendo consumidos, há uma constante libertação de iões, que causa a diminuição do pH. O aumento pode ser explicado pela mesma razão: enquanto alguns compostos vão sendo digeridos e libertando iões, outros acabam por se decompor e a parte que não é digerida pelo microrganismo, cria ligações com os iões anteriormente livres [55].

Comparando as duas figuras, é possível ver que a estabilização de ambos os fatores foi semelhante.

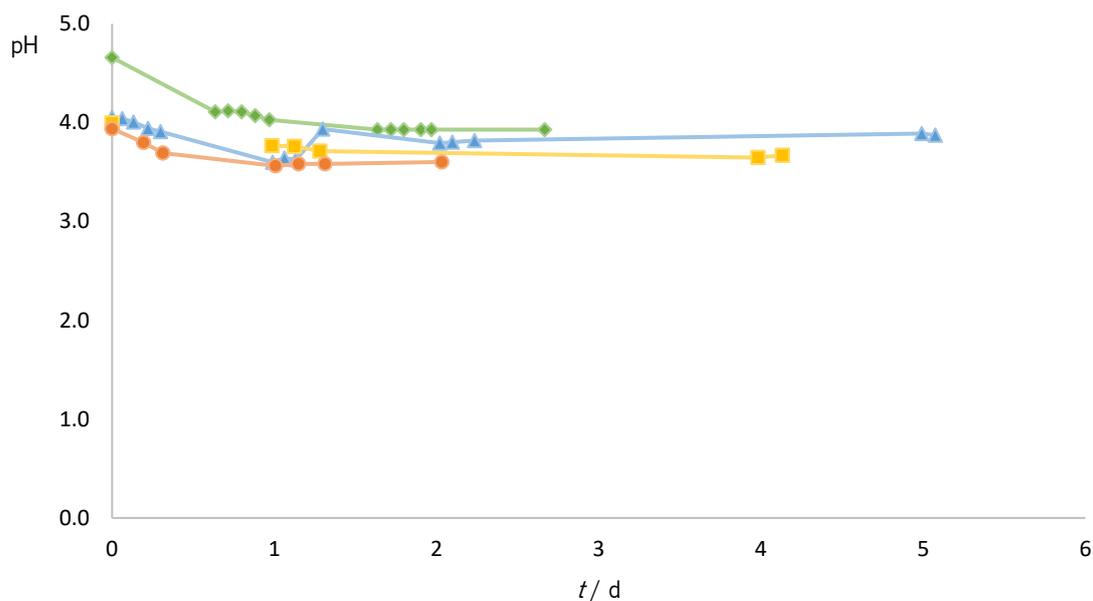


Figura 26: Evolução do pH das fermentações alcoólicas ao longo do tempo: ◆ - vinagre do 1º ensaio; ▲ - vinagre do 2º ensaio; ■ - vinagre do 3º ensaio; ● - vinagre do 4º ensaio.

### Fermentação acética

Na Figura 27 encontra-se representada a evolução °Brix e na Figura 28 a evolução do pH ao longo da fermentação acética dos vários ensaios.

Após os diferentes processos entre as fermentações e a adição dos inóculos, o valor de °Brix alterou-se, iniciando-se assim as fermentações acéticas com os seguintes valores de °Brix: 3,9; 2,2, 5,0 e 3,8, respetivamente.

O primeiro ensaio foi o que demorou mais tempo a estabilizar os valores de °Brix, atingindo 1,8 ao fim de cerca de 15 dias de fermentação. No segundo ensaio, não se verificaram grandes alterações ao longo da fermentação, pelo que foi interrompido ao fim de cerca de 5 dias. O terceiro ensaio, das três fermentações com o mesmo inóculo foi o que estabilizou mais rapidamente o valor de °Brix, estabilizando a 3,7 ao fim de cerca de 8 dias. Isto pode ter acontecido uma vez que neste ensaio não houve remoção do inóculo da 1ª fermentação, resultando em dupla fermentação, potencializando ambas as fermentações. O quarto ensaio foi a fermentação mais lenta, atingindo um °Brix de 3,4 depois cerca de 7 dias, esta fermentação teve de ser interrompida, pelo que estes valores poderiam diminuir mais caso tivesse fermentado durante mais tempo. Como nesta fermentação o substrato principal é o etanol, que não se reflete nos valores de °Brix, não é tão notável a diferença nestes valores ao longo do tempo.

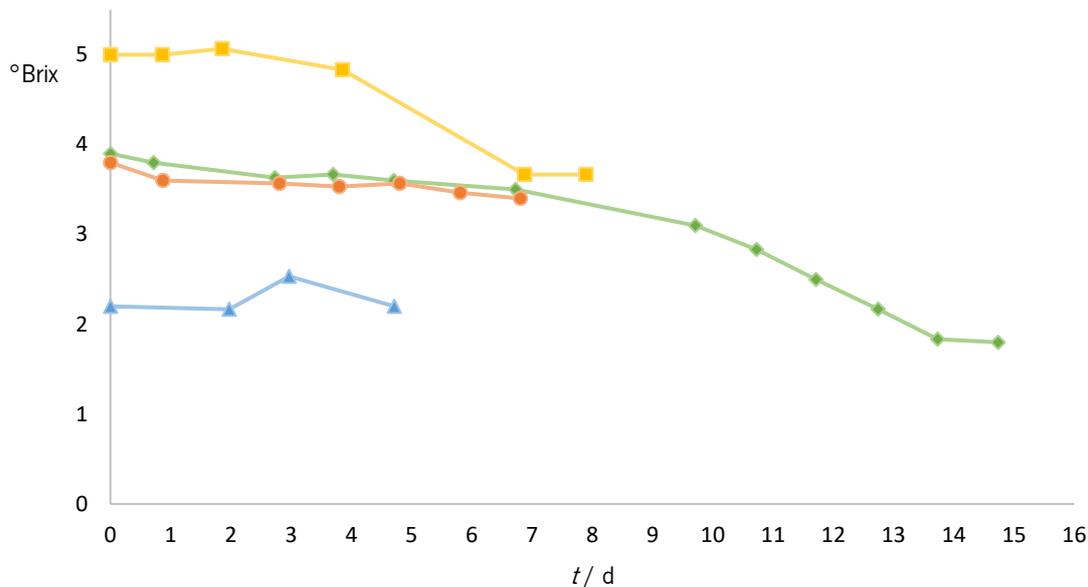


Figura 27: Evolução dos SST ao longo das fermentações acéticas: ◆ - vinagre do 1º ensaio; ▲ - vinagre do 2º ensaio; ■ - vinagre do 3º ensaio; ● - vinagre do 4º ensaio.

De forma semelhante aos valores de °Brix, os valores de pH também alteraram aquando do início da fermentação acética, tendo os vários ensaios iniciado a fermentação com pH de 3,66, 3,76, 3,44 e 3,69. Ambos os parâmetros alteraram-se aquando a adição do inóculo devido ao volume de inóculo adicionado, uma vez que as bactérias não foram isoladas e sim adicionadas diluídas no vinagre e no meio onde se desenvolveram.

Pela análise da Figura 28 é possível ver que a evolução do pH foi semelhante nos vários ensaios, tendo-se verificado um menor valor no terceiro ensaio. No primeiro ensaio, o valor foi descendo até atingir 3,64 e voltar a subir, até atingir um máximo em 4,16 no 11º dia e voltar a descer até aos 3,91. Quando comparando estes valores com a evolução do °Brix, verifica-se que esta subida e descida dos valores de pH acontece quando há uma descida mais notável nos valores de °Brix. No segundo ensaio, tal como aconteceu com os valores de °Brix, também não foi registada alteração nos valores de pH. Já o terceiro ensaio terminou com um pH de 3,27 ao fim de 8 dias. O quarto ensaio terminou a fermentação ao fim de cerca de 7 dias com um pH de 3,53. Tal como já mencionado anteriormente, o substrato da fermentação acético é o etanol que não é tão visível quando se analisa o °Brix, no entanto, a formação de ácido acético altera o pH do meio, tornando-o mais ácido. Assim, pela análise da Figura 28 é possível antever que a produção de ácido acético não será muito eficiente, uma vez que há pouca alteração dos valores de pH.

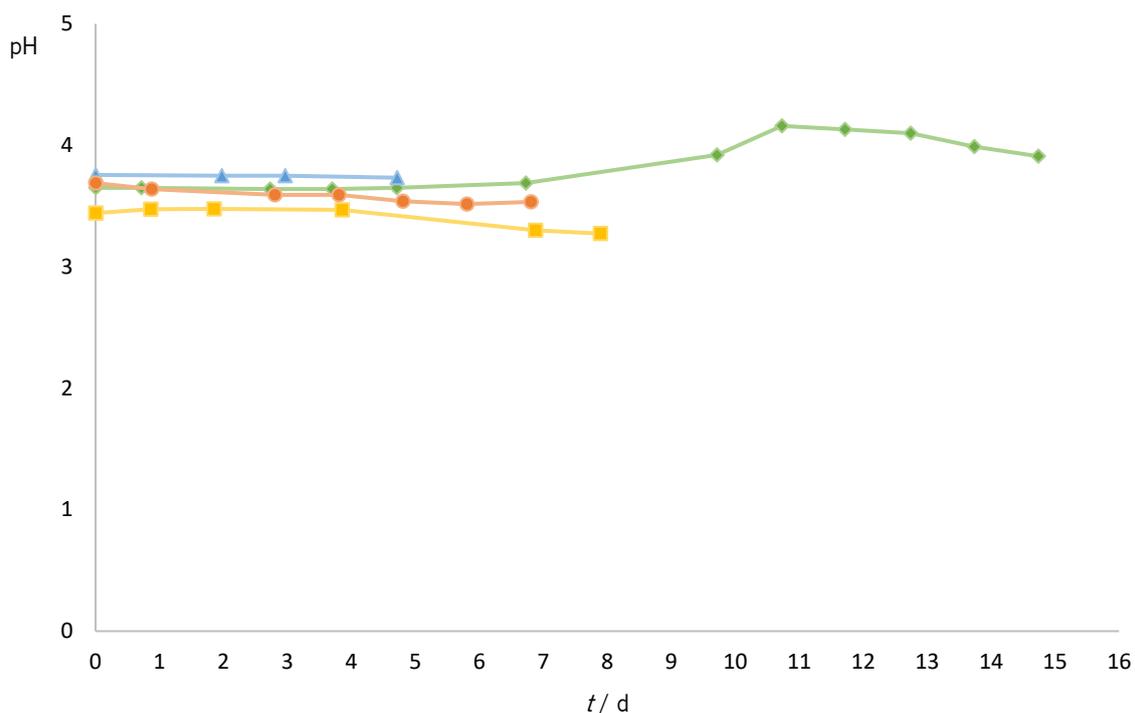


Figura 28: Evolução do pH ao longo das várias fermentações acéticas: - vinagre do 1º ensaio; - vinagre do 2º ensaio; - vinagre do 3º ensaio; - vinagre do 4º ensaio.

A segunda fermentação, após alguns dias foi interrompida, pois como é possível ver, os valores de °Brix e de pH não alteraram. Como o fermentado proveniente da fermentação alcoólica foi autoclavado, ou seja, esteve sob condições de temperatura e pressão elevadas, assumiu-se que o etanol evaporou, daí não haver alteração nos valores de °Brix e de pH.

#### 4.2.2 Teor de ácidos e açúcares

De seguida foi estudada a evolução do consumo dos açúcares e do etanol e da formação de ácido acético ao longo da produção de vinagre. Nas Figura 29, Figura 30 e Figura 31 pode-se ver essa evolução ao longo dos diferentes ensaios. A reta tracejada separa a fermentação alcoólica (lado esquerdo da reta) da fermentação acética (lado direito da reta).

Na Figura 29 encontra-se representada a evolução do consumo dos açúcares totais e a produção de etanol ao longo da fermentação alcoólica e o consumo de etanol e de produção de ácido acético ao longo da fermentação acética do primeiro ensaio. Neste ensaio o inóculo da fermentação alcoólica foi removido por centrifugação antes da fermentação acética. A fermentação alcoólica decorreu durante 3 dias e, pela análise do gráfico, é possível ver que nesse período ocorreu o consumo total dos açúcares e a produção de etanol, a concentração máxima de etanol atingida foi de 42,06 g/L. Esta fermentação iniciou-se com um °Brix de 9,7 o que correspondeu a uma concentração de açúcares totais de 41,56 g/L e ao fim dos

três dias, atingiu uma concentração de 0,31 g/L. No fim da fermentação alcoólica, atingiu-se um rendimento de  $1,04 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$ , com uma produtividade em etanol de 15,77 g/(L d). A fermentação acética decorreu ao longo de quase 15 dias e atingiu o máximo de ácido acético ao fim de cerca de 2,5 dias de fermentação acética, com uma concentração de 10,49 g/L. A partir desse dia a concentração de ácido acético começou a diminuir, bem como a concentração de etanol que começou a diminuir mais rapidamente. Este intervalo de diminuição súbita de concentração de ácido acético e de etanol ocorre quando se verifica uma diminuição mais acentuada do valor do °Brix e aumento do pH, esta alteração pode estar relacionada com o desenvolvimento de outros microrganismos no vinagre ou então poderia ser explicada quando ocorresse consumo total do etanol e as bactérias passariam a consumir o próprio ácido, [56]. Desde o início da fermentação alcoólica que há a presença de cerca de 2 g/L de ácido acético no meio, mas só com o início da fermentação acética é que essa concentração é alterada. No momento em que atingimos o valor máximo de ácido acético produzido, no sexto dia, obtém-se um rendimento de  $1,50 \text{ g}_{\text{ácido acético}}/\text{g}_{\text{etanol}}$  e uma produtividade em ácido acético de 2,88 g/(L d).

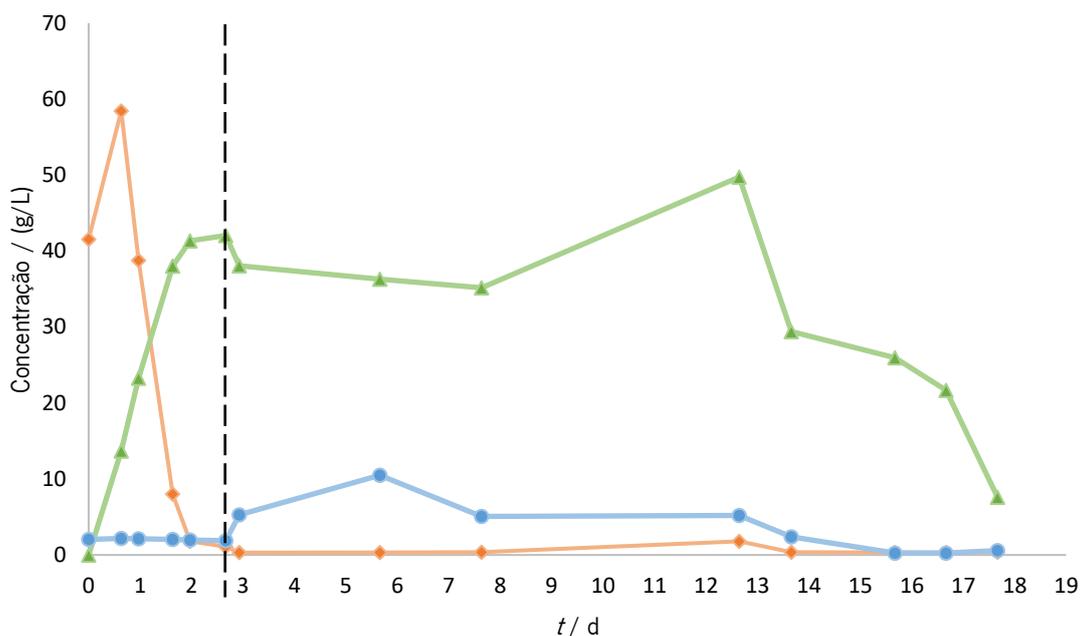


Figura 29: Evolução da concentração dos substratos e produtos ao longo da fermentação do vinagre do 1º ensaio: — [Açúcares totais] (g/L); — [Etanol] (g/L); — [Ácido acético] (g/L).

Na Figura 30 está representada a evolução do consumo dos açúcares totais e a produção de etanol ao longo da fermentação alcoólica e o consumo de etanol e de produção de ácido acético ao longo da fermentação acética do terceiro ensaio. Neste ensaio não houve remoção nem inutilização do inóculo da fermentação alcoólica. Neste ensaio, a fermentação alcoólica durou 4 dias e a fermentação acética durou 8 dias. Verifica-se que não houve consumo total dos açúcares existentes e a quantidade de etanol

produzida durante a fermentação alcoólica foi menor. A fermentação alcoólica iniciou-se com um °Brix de 10,1 e com uma concentração total de açúcares de 113,14 g/L. No fim da fermentação alcoólica atingiu-se uma concentração de etanol de 33,62 g/L, que correspondeu a uma produtividade em etanol de 8,14 g/(L d) e um rendimento de  $0,42 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$ . A fermentação acética decorreu durante 8 dias e verificou-se que ao longo dos dias, o consumo de açúcares foi continuado, bem como a produção de etanol. Pela análise da Figura 30 verifica-se que durante os primeiros 4 dias ocorreu consumo de ambos os substratos das duas fermentações, açúcar e etanol, e produção de ácido acético, produto da segunda fermentação. Isto aconteceu uma vez que não houve remoção do inóculo da fermentação alcoólica e, assim, ambas as fermentações continuaram a ocorrer em simultâneo. Inicialmente, embora ambos os substratos estivessem a ser consumidos, apenas ácido acético estava a ser produzido, mas a partir do oitavo dia, com um consumo maior de açúcares, é possível verificar que houve nova produção de etanol, superior à concentração que estava a ser consumida para a produção de ácido acético, e também uma produção mais significativa de ácido acético. Trabalhos anteriormente realizados concluíram que através desta fermentação dupla, o consumo dos açúcares é maximizado, aumentando a produção de etanol e consequentemente a produção de ácido acético, [57]. A fermentação acética foi interrompida no oitavo dia, mas pelo gráfico percebe-se que teria continuado a haver produção de ácido acético. No fim da fermentação acética, atingiu-se um valor de 10,40 g/L de ácido acético, que correspondeu a um rendimento de  $1,82 \text{ g}_{\text{ácido acético}}/\text{g}_{\text{etanol}}$  e uma produtividade de 1,24 g/(L d).

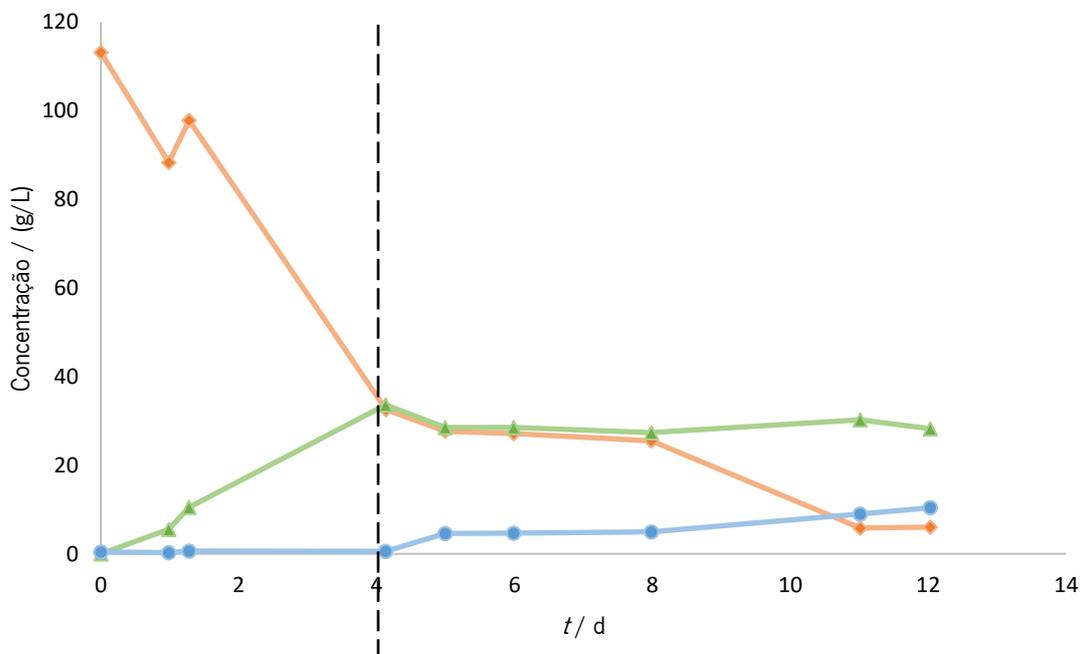


Figura 30: Evolução da concentração dos substratos e produtos ao longo da fermentação do vinagre do 3º ensaio: —◆— [Açúcares totais] (g/L); —▲— [Etanol] (g/L); —●— [Ácido acético] (g/L).

Na Figura 31 está representada a evolução do consumo dos açúcares totais e a produção de etanol ao longo da fermentação alcoólica e o consumo de etanol e de produção de ácido acético ao longo da fermentação acética do quarto ensaio. Neste ensaio o inóculo da fermentação acética foi alterando, trabalhando-se com uma bactéria acética, *Acetobacter syzygii*, e não com vinagre não pasteurizado, sendo que entre as fermentações removeu-se o inóculo da fermentação alcoólica por centrifugação. A fermentação alcoólica durou 2 dias e a fermentação acética durou 7 dias. A fermentação alcoólica, iniciada com um °Brix de 9,9, iniciou-se com uma concentração total de açúcares de 19,98 g/L e atingiu valores perto de 0 ao fim do segundo dia, quando foi terminada a fermentação alcoólica com a formação de 11,32 g/L de etanol. Apesar de se ter removido o inóculo da fermentação alcoólica e de a concentração de açúcares totais ter atingido um valor perto de zero e não ter alterado até ao oitavo dia, durante a fermentação acética ainda houve produção de etanol. No fim da fermentação alcoólica a produtividade em etanol foi de 5,30 g/(L d) e o rendimento foi de 0,54  $g_{\text{etanol}}/g_{\text{substrato}}$ . A fermentação acética durou 7 dias, ao longo desse período observa-se formação de etanol nos primeiros 2 dias, consumo de etanol nos restantes e uma maior produção de ácido acético nos últimos 5 dias. O valor máximo de etanol foi atingido no terceiro dia de fermentação acética com uma concentração de 14,23 g/L, terminando a fermentação acética com 13,32 g/L de etanol, considerando este valor, a produtividade em etanol e o rendimento ficam corrigidos para 2,74 g/(L d) e 0,69  $g_{\text{etanol}}/g_{\text{substrato}}$ , respetivamente. O pico de ácido acético foi atingido ao fim de 4 dias de fermentação acética com uma concentração de 0,65 g/L. Calculando o rendimento da fermentação entre o momento em que se obteve maior concentração de etanol e o fim da fermentação acética, obtém-se uma produtividade em ácido acético de 0,04 g/(L d) e um rendimento de 0,16  $g_{\text{ácido acético}}/g_{\text{etanol}}$ . Os resultados deste ensaio comprovam que uma única bactéria possui menor rendimento do que uma mistura de bactérias, como é o caso do vinagre não pasteurizado. Neste ensaio não se estudou a absorvência do vinagre não pasteurizado nem do meio de bactérias acéticas antes destas serem adicionadas ao fermentado alcoólico, a quantidade de bactérias presentes num meio e no outro pode ter sido bastante diferente, explicando também a diferença de produtividade e de rendimento entre os ensaios.

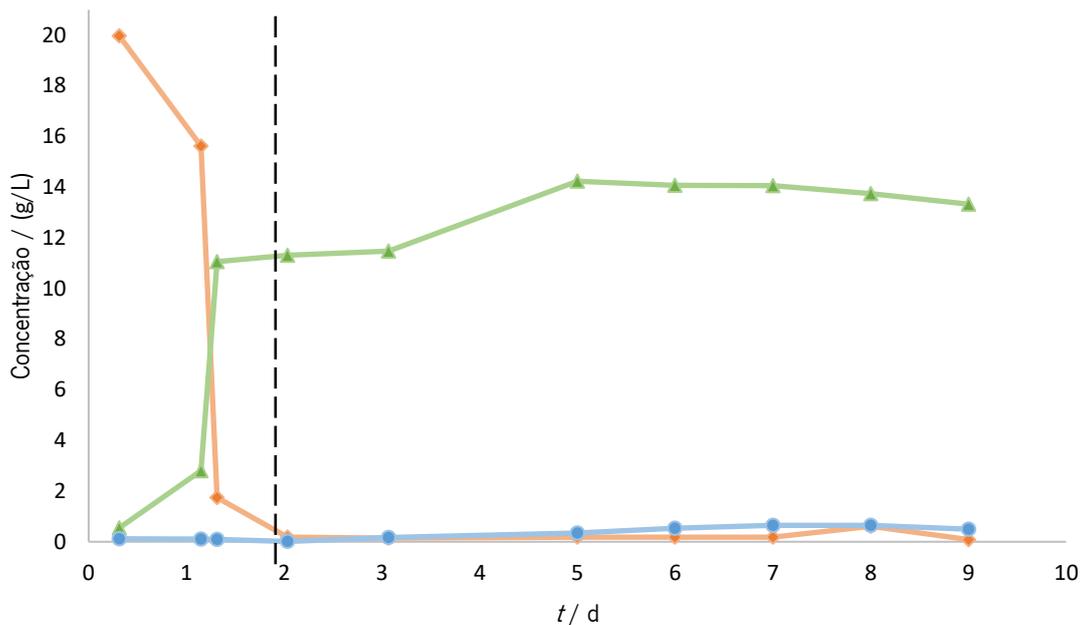


Figura 31: Evolução da concentração dos substratos e produtos ao longo da fermentação do vinagre do 4º ensaio: —♦— [Açúcares totais] (g/L); —▲— [Etanol] (g/L); —●— [Ácido acético] (g/L).

Na Tabela 6 estão sintetizados os valores da produtividade e rendimento em etanol e produtividade e rendimento em ácido acético dos tempos em que foi obtida a maior concentração do respectivo composto. Comparando os vários valores entre as fermentações, observa-se que dos três ensaios, o primeiro ensaio obteve melhor produtividade tanto em etanol como em ácido acético, ou seja, ao longo dos dias em que se verificou produção de etanol e de ácido acético, no primeiro ensaio foi onde essa concentração foi maior. No entanto, a nível de rendimento tanto de etanol como de ácido acético, o terceiro ensaio obteve melhores resultados significando que nesse ensaio houve maior conversão de açúcar em etanol e conversão de etanol em ácido acético, isto pode ter acontecido devido à presença contínua de leveduras e bactérias.

Seria de esperar que a nível da fermentação alcoólica os valores de rendimento e produtividade fossem semelhantes, porém tal não se verificou. Essa diferença pode ser explicada com o facto de que as fermentações do primeiro ensaio realizaram-se com um pH mais elevado do que as fermentações do terceiro e quarto ensaios; por outro lado, estes dados são obtidos em função da concentração obtida por HPLC e os ensaios 1 e 3 foram analisados por equipamento e por diferentes curvas de calibração do 4º ensaio, ou seja, o cálculo da concentração do 4º ensaio pode não estar corretamente lida, comparativamente aos outros dois ensaios.

Tabela 6: Produtividade e rendimento em etanol e produtividade e rendimento em ácido acético

	Produtividade em etanol g/L d	Rendimento de etanol $g_{\text{etanol}}/g_{\text{substrato}}$	Produtividade em ácido acético g/L d	Rendimento de ácido acético $g_{\text{ácido acético}}/g_{\text{etanol}}$
1º ensaio	15,77	1,04	2,88	1,50
3º ensaio	8,14	1,24	0,42	1,82
4º ensaio	2,74	0,69	0,04	0,16

#### 4.2.3 Acidez total

Como forma de se estudar e avaliar a fermentação acética, realizaram-se titulações com a amostra de vinagre para perceber qual o ponto de acidez do vinagre

Na Figura 32 está representada a evolução da acidez total ao longo do tempo de fermentação acética dos ensaios 1, 3 e 4.

Ao longo da fermentação acética a concentração de ácido acético aumenta, o que resulta numa diminuição do pH que traduz o aumento da acidez do meio. Assim é esperado que a acidez total vá aumentando ao longo da fermentação acética.

Como visto anteriormente, ao longo do 1º ensaio a concentração de ácido acético aumenta ao longo dos primeiros 2,5 dias e depois diminui até ao fim da fermentação acética. Com esta evolução da concentração de ácido acético espera-se que a acidez traduza o mesmo: uma subida nos primeiros dias e depois uma descida de acidez até ao fim do ensaio. Pela análise da Figura 32.A é possível ver que tal acontece: ao longo dos primeiros 5 dias de fermentação acética há um ligeiro aumento da acidez até 8,38 %, no quinto dia de fermentação e depois há uma queda até aos últimos dias de fermentação, acabando com um valor de acidez de 3,12 %.

Já no caso dos vinagres obtidos no 3º e 4º ensaios, a acidez do vinagre aumenta ao longo do tempo, demonstrando que há aumento de ácido acético ao longo da fermentação o que vai de acordo com a variação do pH ao longo da fermentação acética. Na Figura 32.B é possível ver que o vinagre do 3º ensaio acaba a fermentação com 15,61 %. Na Figura 32.C vê-se que o vinagre do 4º ensaio acaba a fermentação com 5,27 %.

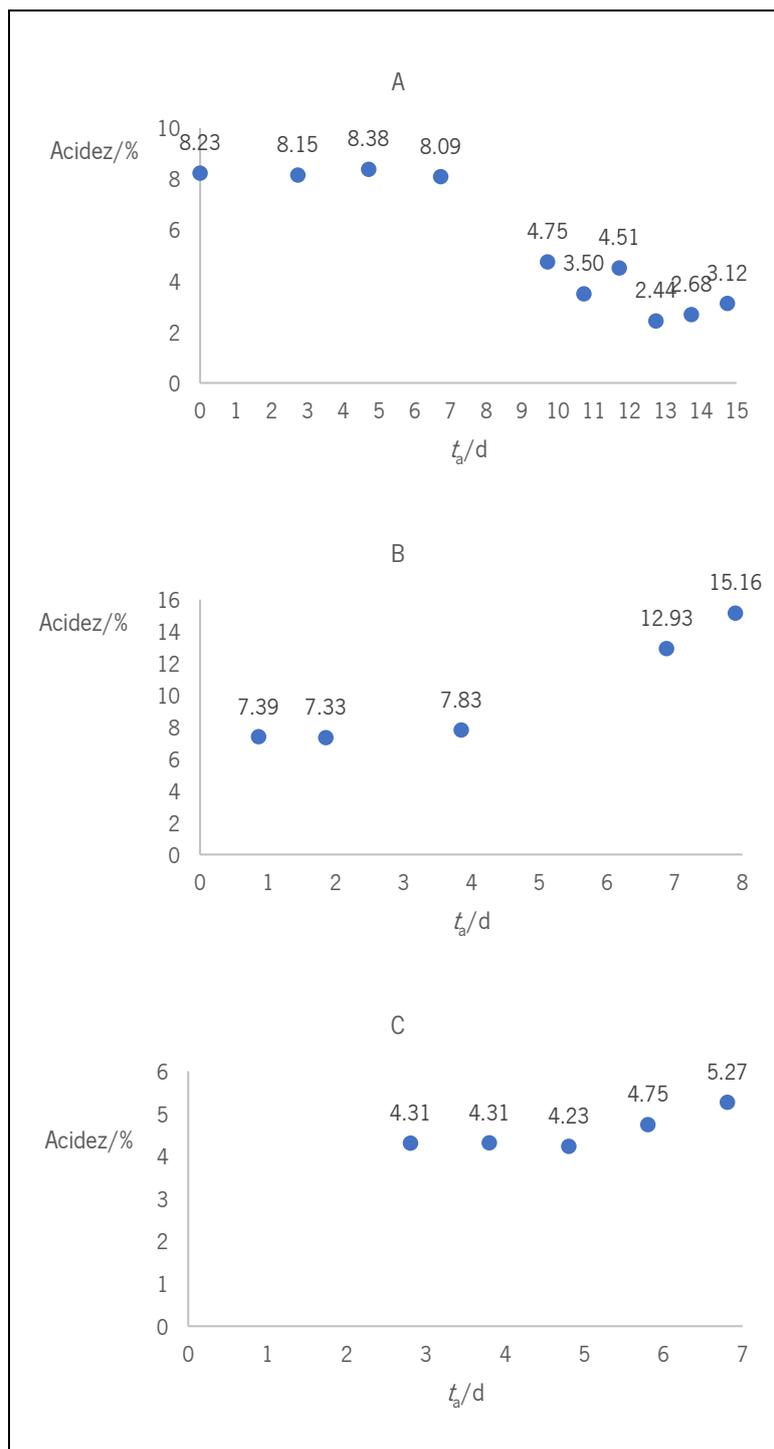


Figura 32: Evolução da acidez total ao longo da fermentação acética ( $t_a$ ) do vinagre: A - 1º ensaio; B - 2º ensaio; C - 3º ensaio.

Dos três ensaios, o único que se encontra dentro dos valores estabelecidos (50 g/L ou 5 %) é o vinagre obtido pela bactéria *Acetobacter syzygii*, sendo que os outros dois vinagres obtidos, no ponto máximo de produção de ácido acético, teriam de ser diluídos para serem consumidos.

Comparando os valores de acidez com os valores da concentração de ácido acético ao longo dos três ensaios, percebe-se que os valores obtidos pela segunda curva de calibração para a concentração dos compostos da 4º fermentação não devem estar corretos, uma vez que os três vinagres foram titulados

segundo o mesmo protocolo e a razão entre os valores da acidez dos três vinagres e a respectiva concentração não correspondem. Por exemplo para uma acidez perto dos 50 % para o primeiro e quarto ensaios corresponde mais ou menos aos dias 9 e 6,5 das respectivas fermentações e a concentração de ácido acético para esses dias foi, respetivamente 0.59 g/L e mais ou menos 5 g/L.

## 5 Conclusão

O objetivo deste projeto foi produzir um sumo probiótico que fosse tanto sustentável como nutritivo: utilizando as maçãs que de outra forma acabariam por ser desperdiçadas e, juntando às características saudáveis da maçã, trouxesse benefícios para o consumidor. Com o mesmo objetivo projetou-se também a produção de vinagre.

Relativamente ao sumo fermentado conclui-se que quando adicionado extrato de levedura numa concentração de 4 g/L, a bactéria *Lacticaseibacillus casei* desenvolve-se mais rapidamente, o que leva a uma maior produção de ácido láctico. Quando comparando os sumos onde se adicionou extrato de levedura com os que não tiveram extrato de levedura adicionado, os primeiros tiveram uma concentração final de ácido láctico de 2,65 g/L, 2,74 g/L e 2,68 g/L, os segundos obtiveram uma concentração final de ácido láctico de 1,91 g/L, 0,64 g/L e 0,49 g/L para os sumos de maçã Fuji, Golden Delicious e Royal Gala, respetivamente.

Foram realizadas provas sensoriais com os sumos onde foi adicionado extrato de levedura e com sumos idênticos não fermentados, daqui concluiu-se que os provadores tiveram mais preferência pelos sumos não fermentados. Entre os sumos fermentados, o sumo de Golden Delicious foi o que obteve melhor apreciação, tendo sido caracterizado como o melhor nos parâmetros de aspeto geral, cor, aroma, sabor, doçura e apreciação global, o sumo Fuji foi o considerado como o sabor mais acético

Assim pode-se concluir que é possível produzir um sumo de maçã probiótico e que para um sumo mais saudável, com maior concentração de bactérias probióticas, deve-se adicionar extrato de levedura pois estimula o seu desenvolvimento. Por outro lado, a sua fermentação tem de ser controlada e com duração inferior a 9 dias, para evitar que o produto final fique com um sabor semelhante a vinagre.

Relativamente ao vinagre, foram estudados dois inóculos para a fermentação acética: vinagre não-pasteurizado e *Acetobacter syzygii* e três procedimentos entre fermentações com o vinagre não pasteurizado: não autoclavar, com e sem centrifugação e autoclavar mas sem centrifugação. Dos três procedimentos o que obteve melhor resultados foi onde não houve autoclavagem nem centrifugação entre fermentações, obtendo um rendimento de  $1,82 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$ , por outro lado o procedimento que obteve melhor produtividade em ácido acético foi o procedimento onde o fermentado da fermentação alcoólica foi apenas centrifugado com uma produtividade de  $2,88 \text{ g}/(\text{L d})$  em ácido acético. O ensaio com a bactéria acética foi onde foram obtidos os piores resultados com  $0,16 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$  e  $0,04 \text{ g}/(\text{L d})$  de ácido acético.

Futuramente pode-se estudar a produção de sumos probióticos e de vinagre à base da mistura de várias variedades de maçã. De forma semelhante, pode-se estudar a produção de ambos os produtos com

outros microrganismos, nomeadamente outras bactérias probióticas e outras bactérias acéticas. Relativamente aos processos fermentativos pode-se estudar a influência da produção de ácido láctico com a opinião dos provadores e o arejamento na fermentação acética.

## Bibliografia

- [1] “Produção de maçã em Portugal em máximos de 33 anos,” 2019. <https://www.idealista.pt/news/financas/economia/2019/11/25/41609-producao-de-maca-em-portugal-em-maximos-de-33-anos> (consultado em Mar. 10, 2021).
- [2] Canteri, M. H. G., Nogueira, A., de Oliveira Petkowicz, C. L., Wosiacki, G., “Characterization of Apple Pectin – A Chromatographic Approach,” in *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, InTech, 2012. doi: 10.5772/52627.
- [3] “FAOSTAT.” <https://www.fao.org/faostat/en/#compare> (consultado em Nov. 24, 2021).
- [4] Watson, B., *Cider, Hard and Sweet: History, Traditions, and Making Your Own*, 3rd ed. The Countryman Press, 2013.
- [5] Feliciano, R. P., Antunes, C., Ramos, A., Serra, A. M., Figueira, M. E., Duarte, C. M. M., de Carvalho, A., Bronze, M. R., “Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory evaluation,” *Journal of Functional Foods* 2(1): 35–45, Jan. 2010, doi: 10.1016/J.JFF.2009.12.004.
- [6] “Colheita de Maçã de Alcobaca IGP em 2020 deve atingir 60.000 t | Revista Frutas Legumes e Flores.” <https://www.fffrevista.pt/2020/08/colheita-de-maca-de-alcobaca-igp-em-2020-deve-atingir-60-000-t/> (consultado em Nov. 23, 2021).
- [7] “Variedades de maçãs e as suas características | VortexMag.” <https://www.vortexmag.net/9-variedades-de-macas-e-as-suas-caracteristicas/> (consultado em Nov. 23, 2021).
- [8] “Red Delicious - Washington Apples.” <https://waapple.org/varieties/red-delicious/> (consultado em Nov. 23, 2021).
- [9] “Types of Apples to Know | Epicurious.” <https://www.epicurious.com/expert-advice/types-and-varieties-of-apples-article> (consultado em Nov. 23, 2021).
- [10] “Jonagold - Washington Apples.” <https://waapple.org/varieties/jonagold/> (consultado em Nov. 23, 2021).
- [11] “Maca Casanova | Neomaquina Supermercados.” <https://neomaquina.pt/p/maca-casanova> (consultado em Dec. 07, 2021).
- [12] “All Apple Varieties - Washington Apples.” <https://waapple.org/varieties/all/> (consultado em Dec. 07, 2021).
- [13] “Maçã Pink Lady (mais doce!) – 1 unid. (125g) – Hortah.” <https://hortah.com/produto/maca-pink-lady/> (consultado em Dec. 07, 2021).

- [14] “Maçã Reineta | Narc Frutas.” <http://www.narcfrutas.com/produto/maca-reineta/?id=14> (consultado em Nov. 23, 2021).
- [15] “Maçã Reineta | Narc Frutas.” <http://www.narcfrutas.com/produto/maca-reineta/?id=14> (consultado em Dec. 07, 2021).
- [16] G. Campeanu, G. Neata, and G. Darjanschi, “Chemical Composition of the Fruits of Several Apple Cultivars Growth as Biological Crop,” *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 37(2): 161–164, 2009
- [17] Boyer, F., Liu, R. H., “Apple phytochemicals and their health benefits,” *Nutrition Journal* 3(5) 2004
- [18] Mitsuoka, T., “Development of functional foods,” *Bioscience of microbiota, food and health* 33(3): 117–128, 2014, doi: 10.12938/BMFH.33.117.
- [19] Moraes, F. P., Colla, L. M., “Alimentos funcionais e nutraceuticos definições, legislação e benefícios à saúde,” *Revista Eletrônica de Farmácia* 3(2): 109–122, 2006.
- [20] Kaur, S., Das, M., “Functional foods: An overview,” *Food Science and Biotechnology* 20(4): 861–875, Aug. 2011, doi: 10.1007/s10068-011-0121-7.
- [21] Saher, M., Arvola, A., Lindeman, M., Lähteenmäki, L., “Impressions of functional food consumers,” *Appetite* 42(1): 79–89, 2005, doi: 10.1016/j.appet.2003.07.002.
- [22] Urala, N., Lähteenmäki, L., “Consumers’ changing attitudes towards functional foods,” *Food Quality and Preference* 18(1): 1–12, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.foodqual.2005.06.007.
- [23] “Probióticos, prebióticos e simbióticos,” *Food Ingredientes Brasil*, pp. 59–65, 2011. Consultado em: Nov. 25, 2021
- [24] Fooks, L. J., Fuller, R., Gibson, G. R., “Prebiotics, probiotics and human gut microbiology,” *International Dairy Journal* 9(1): 53–61, Jan. 1999, doi: 10.1016/S0958-6946(99)00044-8.
- [25] de Lima, F. R. B., da Silva, R. C. O., da Silva, K. M. C., da Silva, C. G. M., “A IMPORTÂNCIA DO CONSUMO DE ALIMENTOS PROBIÓTICOS À SAÚDE HUMANA.”
- [26] Wang, X., Han, M., Zhang, M., Wang, Y., Ren, Y., Yue, T., “In vitro evaluation of the hypoglycemic properties of lactic acid bacteria and its fermentation adaptability in apple juice,” *LWT* 136, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2020.110363.
- [27] Chua, K. J., Kwok, W. C., Aggarwal, N., Sun, T., Chang, M. W., “Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases,” *Current Opinion in Chemical Biology* 40: 8–16, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.CBPA.2017.04.011.

- [28] Galdeano, C. M., Cazorla, S. I., Dumit, J. M. L., Vélez, E., Perdigón, G., “Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System,” *Annals of nutrition & metabolism* 74(2): 115–124, Feb. 2019, doi: 10.1159/000496426.
- [29] Amara, A. A., Shibl, A., “Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management,” *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ* 23(2): 107, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.JSPS.2013.07.001.
- [30] Terraf, M. C. L., Tomás, M. S. J., Rault, L., le Loir, Y., Even, S., Nader-Macías, M. E. F., “In vitro effect of vaginal lactobacilli on the growth and adhesion abilities of uropathogenic *Escherichia coli*,” *Archives of microbiology* 199(5): 767–774, Jul. 2017, doi: 10.1007/S00203-016-1336-Z.
- [31] Barbieri, N., Herrera, M., Salva, S., Villena, J., Alvarez, S., “Lactobacillus rhamnosus CRL1505 nasal administration improves recovery of T-cell mediated immunity against pneumococcal infection in malnourished mice,” *Beneficial microbes* 8(3): 393–405, 2017, doi: 10.3920/BM2016.0152.
- [32] Hao, Q., Dong, B. R., Wu, T., “Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections,” *The Cochrane database of systematic reviews*, (2) Feb. 2015, doi: 10.1002/14651858.CD006895.PUB3.
- [33] Russo, F., Linsalata, M., Orlando, A., “Probiotics against neoplastic transformation of gastric mucosa: Effects on cell proliferation and polyamine metabolism,” *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20(37): 13258, Oct. 2014, doi: 10.3748/WJG.V20.I37.13258.
- [34] de Leblanc, A.M., Perdigón, G., “The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation,” *The Proceedings of the Nutrition Society* 69(3): 421–428, Aug. 2010, doi: 10.1017/S002966511000159X.
- [35] Awaisheh, S. S., “Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing,” *Probiotics*, Oct. 2012, doi: 10.5772/51267.
- [36] “A palavra vinagre: história e estórias!” <http://portuguesemforma.blogspot.com/2014/02/a-palavra-vinagre-historia-e-estorias.html> (consultado em Nov. 25, 2021).
- [37] Real, H., Barbosa M., Carvalho, T., *Vinagres, temperar o saber!* 2017.
- [38] Veloso, C. L., *Sistema de produção de vinagre*. 2013.
- [39] “Vinho para acetificação.” <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/acetificacao.htm> (consultado em Nov. 26, 2021).

- [40] Mindelo, J. O., Glins, B. S., Favacho, C. B., Gomes, T. C., Rocha, A., “Determinação do teor de ácido acético em amostras comerciais de vinagre,” *IV Congresso Internacional das Ciências Agrárias*. 2019.
- [41] Budak, N. H., Aykin, E., Seydim, A. C., Greene, A. K., Guzel-Seydim, Z. B., “Functional properties of vinegar,” *Journal of food science*. 79(5) 2014, doi: 10.1111/1750-3841.12434.
- [42] Adams, M. R., Moss, M. O., *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry, 1995.
- [43] Wang, L., Fan, D., Chen, W., Terentjev, E. M., “Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces,” *Scientific Reports* 5(1): 1–11, Oct. 2015, doi: 10.1038/srep15159.
- [44] Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., Pilizota, T., “General calibration of microbial growth in microplate readers,” *Scientific Reports* 6(1): 1–7, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep38828.
- [45] Bao, H., Yu, X., Xu, C., Li, X., Li, Z., Wei, D., Liu, Y., “New toxicity mechanism of silver nanoparticles: Promoting apoptosis and inhibiting proliferation,” *PLoS ONE* 10(3), Mar. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0122535.
- [46] Jay, J. M., *Modern Food Microbiology*, 5th ed. Chapman & Hall, 1996.
- [47] Walker, G. M., *Yeast physiology and biotechnology*. J. Wiley & Sons, 1998.
- [48] Gomes, R. J., Borges, M. F., Rosa, M. F., Castro-Gómez, R. J. H., Spinosa, W. A., “Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications,” *Food Technology and Biotechnology* 56(2): 139–151, Apr. 01, 2018. doi: 10.17113/ftb.56.02.18.5593.
- [49] König, H., Gottfried, U., Fröhlich, J., *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 2nd ed. Springer, Cham, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-60021-5\_1.
- [50] Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., el Enshasy, H., “Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals,” *FEMS Microbiology Letters* 365(20): 213, Oct. 2018, doi: 10.1093/FEMSLE/FNY213.
- [51] Regulamento (CEE) n° 2676/90 da Comissão de 17 de Setembro de 1990, que determina os métodos de análise comunitários aplicáveis no sector do vinho (OJ L 272 17.09.1990, p. 1, CELEX: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:31990R2676>)
- [52] Wenzl, T, Johannes, H, Schaechtele, A, Robouch, P, Stroka, J, Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food. EUR 28099 EN. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union; 2016. JRC102946

- [53] Chan-Blanco, Y., Bonilla-Leiva, A. R., Velázquez, A. C., "Using banana to generate lactic acid through batch process fermentation," *Applied microbiology and biotechnology* 63(2): 147–152, Dec. 2003, doi: 10.1007/S00253-003-1374-8.
- [54] Kayikci, Ö., Nielsen, J., "Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Research* 15(6): 68, Sep. 2015, doi: 10.1093/FEMSYR/FOV068.
- [55] Akin, H., Brandam, C., Meyer, X. M., Strehaiano, P., "A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by *Saccharomyces cerevisiae*," *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 47(11): 1986–1993, Oct. 2008, doi: 10.1016/J.CEP.2007.11.014.
- [56] Saeki, A., Taniguchi, M., Matsushita, K., Toyama, H., Theeragool, G., "Microbiological Aspects of Acetate Oxidation by Acetic Acid Bacteria, Unfavorable Phenomena in Vinegar Fermentation," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61(2): 317–323, 1997, doi: 10.1271/bbb.61.317.
- [57] Rosada, K. K., "Streamlining the Fermentation Process Using Mixed Cultures," *New Advances on Fermentation Processes*, Sep. 2019, doi: 10.5772/INTECHOPEN.87205.

## Anexos

Anexo A.	Lista de equipamentos .....	59
Anexo B.	Exemplo de cálculos .....	61
	Exemplo de cálculo para a acidez total.....	61
	Exemplo de cálculo do volume de fase móvel gasto .....	61
	Exemplo de cálculo da produtividade e do rendimento .....	61
Anexo C.	HPLC: curvas de calibração, tempos de retenção e limites de deteção e quantificação ...	63
	Primeira curva de calibração .....	63
	Tempo de retenção .....	63
	Curva de calibração.....	63
	Limites de deteção e limite de quantificação .....	66
	Segunda curva de calibração .....	67
	Tempo de retenção .....	67
	Curva de calibração.....	67
	Limites de deteção e limite de quantificação .....	70
Anexo D.	Questionário da Análise sensorial.....	71
Anexo E.	Resultados das provas sensoriais.....	72
	Sumo de maçã da variedade Fuji fermentado .....	72
	Sumo de maçã da variedade Fuji não fermentado.....	73
	Sumo de maçã da variedade Golden Delicious fermentado.....	74
	Sumo de maçã da variedade Golden Delicious não fermentado .....	75
	Sumo de maçã da variedade Royal Gala fermentado .....	76
	Sumo de maçã da variedade Royal Gala não fermentado .....	77

## Anexo A. Lista de equipamentos

Tabela A-1: Lista de equipamentos e respectivas especificações técnicas

Refratômetro	
	Marca: HANNA HI 96841
	Gama: 0 – 30 °Brix
	Resolução: 0,1 °Brix
	Precisão: $\pm 0,3$ °Brix
Medidor de pH	
	Marca: HANNA HI 2215 pH/ORP Meter
	Gama: -2,00 – 16,00 pH
	Resolução: 0,01 pH
	Precisão: $\pm 0,1$ pH
Espectrofotômetro	
	Marca: Jasco, V-560
	Gama: 190 – 900 nm
	Resolução: 0,01 nm
	Precisão: $\pm 0,3$ nm
Incubadora	
	Marca: IKA KS 4000 i control
	Gama de temperatura: 5 – 80 °C
	Estabilidade térmica: $\pm 0,1$ °C
	Gama de velocidade: 10 – 500 min <sup>-1</sup>

Tabela A-2: Lista de equipamentos e respectivas especificações técnicas (continuação)

Titulador	
	Marca: Metrohm 902 Titrando
	Resolução: 0,001 pH
	Intervalo de medição: 100 ms
Coluna de HPLC	
	Marca: Aminex HPX-87P Column
	Diâmetro interno: 7,8 mm
	Comprimento: 300 mm
	Tamanho da partícula: 9,0 µm
	pH estável: 5,0 – 9,0

## Anexo B. Exemplo de cálculos

### Exemplo de cálculo para a acidez total

Considerando o 14,74º dia da fermentação acética do primeiro ensaio, durante a titulação o volume inicial ( $V_0$ ) é 0 mL, o volume final ( $V_f$ ) são 6,86 mL e o volume da amostra ( $V_{amostra}$ ) é de 5 mL  
Calculando o volume total  $V_t$

$$V_t = V_f - V_0 = 6,86 - 0 = 6,86 \text{ mL}$$

Então, substituindo na Equação 1:

$$Acidez = \frac{6,86 \times 0,6004 \times 0,1}{5} \times 100 = 8,23 \%$$

Obtém-se uma percentagem de acidez de 8,23 %

Este cálculo foi idêntico para todas as amostras retiradas relativas à fermentação acética, apenas diferendo nos volumes inicial e final de cada uma delas.

### Exemplo de cálculo do volume de fase móvel gasto

Considerando um ensaio onde se pretende ler 40 amostras, com um caudal de 0,5 mL/min, onde se sabe que o último composto a ser analisado é lido aos 30 min e, portanto, usamos um tempo de leitura de 35 min, usando a Equação 2:

$$V_{fm} = 40 \times 0,5 \times 35 = 700 \text{ mL}$$

Considerando que o volume de 150 mL de solução a mais que é necessário preparar para assegurar a preservação do magneto, preparou-se assim 850 mL de solução de  $H_2SO_4$  5 mmol/L.

### Exemplo de cálculo da produtividade e do rendimento

A produtividade de produto de reação ( $P$ ), é dada pela Equação 3, onde  $t_f$ ,  $t_0$ , representam, respetivamente, o tempo no fim e no início da fermentação e  $C$  a concentração nos respetivos tempos.

$$P = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{C_f - C_0}{t_f - t_0} \quad \text{Equação 3}$$

Considerando o 2,67º dia da fermentação alcoólica do primeiro ensaio, onde a concentração inicial e final do etanol são 0 e 42,06 g/L, respetivamente:

$$P = \frac{42,06 - 0}{2,67 - 0} = 15,77 \text{ g/(L d)}$$

O rendimento de produto por substrato ( $Y_{P/S}$ ) é dado pela Equação 4, onde  $C$  representa a concentração do produto,  $P$ , e do substrato,  $S$ .

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta C_P}{\Delta C_S} = \frac{C_{P_f} - C_{P_0}}{C_{S_0} - C_{S_f}} \quad \text{Equação 4}$$

Considerando as concentrações inicial e final dos açúcares totais e do etanol são 41,56 e 1,08 e 0 e 42,06 g/L, respetivamente:

$$Y_{P/S} = \frac{42,06 - 0}{41,56 - 1,08} = 1,04 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$$

Para o uso de ambas as equações tem de se estar atento a qual o produto, o substrato e o tempo correto a usar.

## **Anexo C. HPLC: curvas de calibração, tempos de retenção e limites de detecção e quantificação**

Por causa de problemas com o equipamento foi necessário recorrer a dois equipamentos de HPLC, tendo ambos usado a mesma coluna e tendo sido realizada uma curva de calibração e determinados novos tempos de retenção para cada equipamento.

A primeira curva foi usada para calcular as concentrações dos constituintes das amostras recolhidas ao longo do primeiro, segundo e terceiro ensaios, para os sumos e para o vinagre. A segunda curva foi usada para determinar as concentrações dos constituintes das amostras recolhidas ao longo do quarto, para os sumos e para o vinagre

### **Primeira curva de calibração**

Tempo de retenção

Os seguintes tempos de retenção foram usados para a detecção de açúcares, ácidos orgânicos e um álcool para eluente 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com um caudal de 0,05 mL/min a uma temperatura de 25 °C.

*Tabela C-1: Tempos de retenção da primeira curva de calibração de HPLC*

Composto	Tempo de retenção min
Sacarose	9,19
Glucose	10,79
Frutose	12,02
Etanol	23,68
Ácido cítrico	7,43
Ácido láctico	15,458
Ácido acético	18,09

Curva de calibração

As curvas de calibração a seguir apresentadas foram obtidas através da concentração do composto em função da área obtida para o pico no tempo de retenção acima referido.

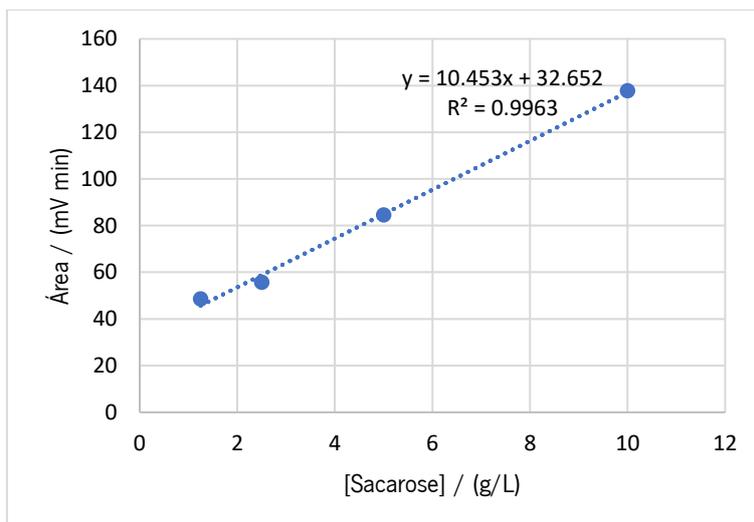


Figura C-1: Curva de calibração da sacarose.

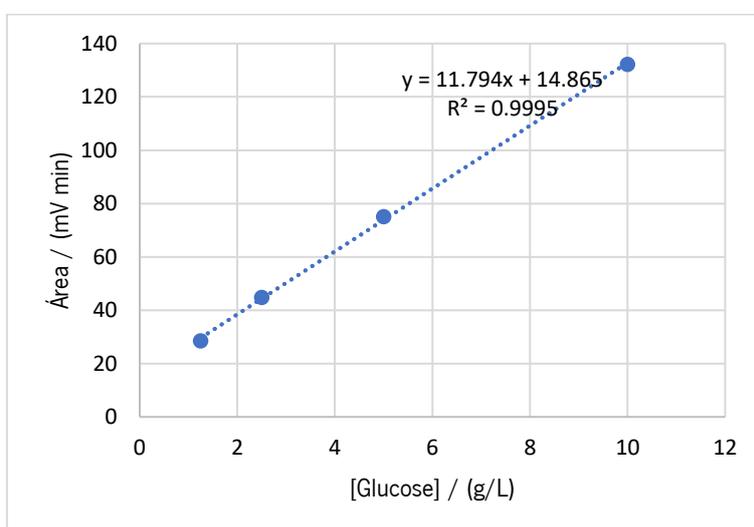


Figura C-2: Curva de calibração da glicose.

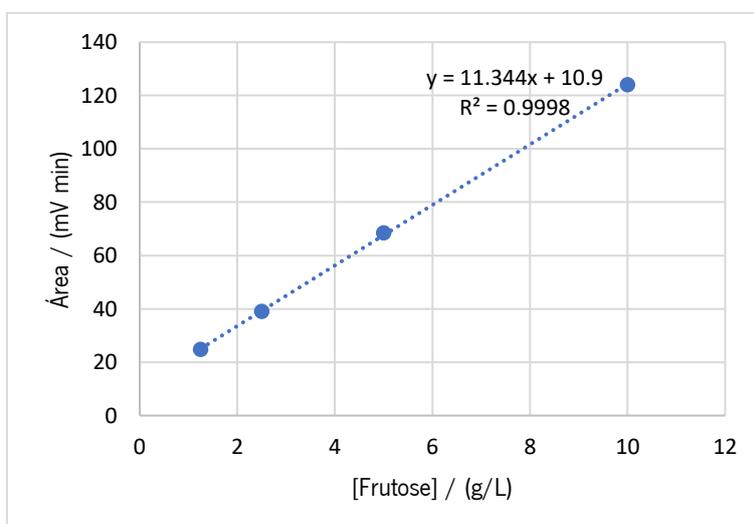


Figura C-3: Curva de calibração da frutose.

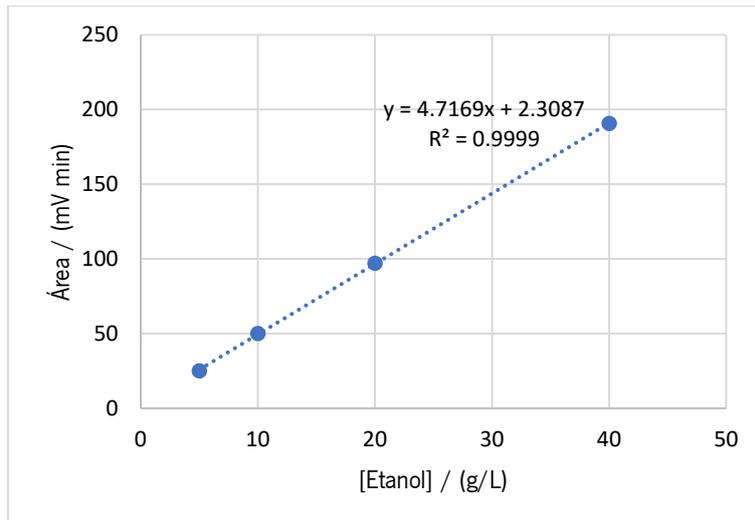


Figura C-4: Curva de calibração do etanol.

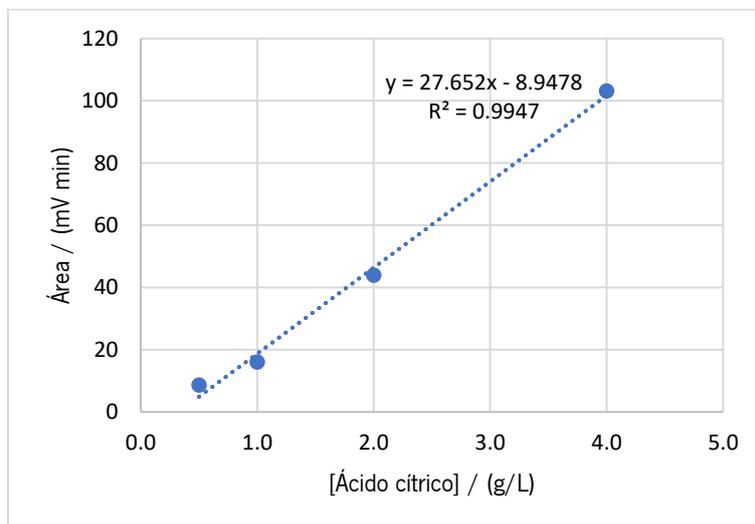


Figura C-5: Curva de calibração do ácido cítrico.

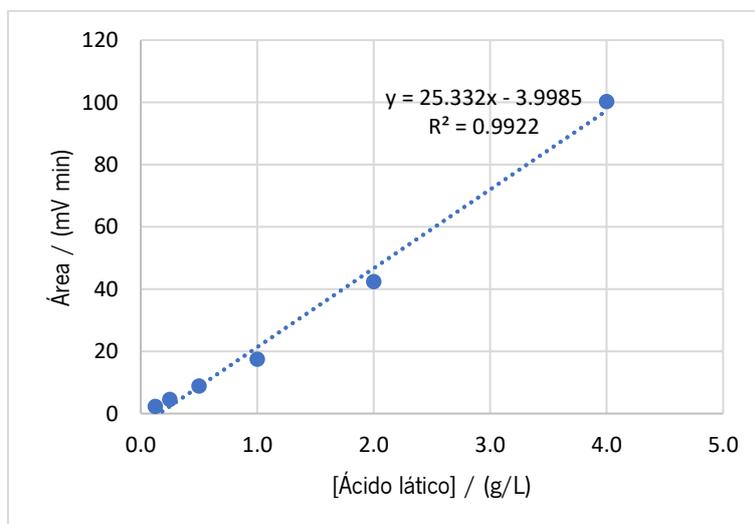


Figura C-6: Curva de calibração do ácido láctico.

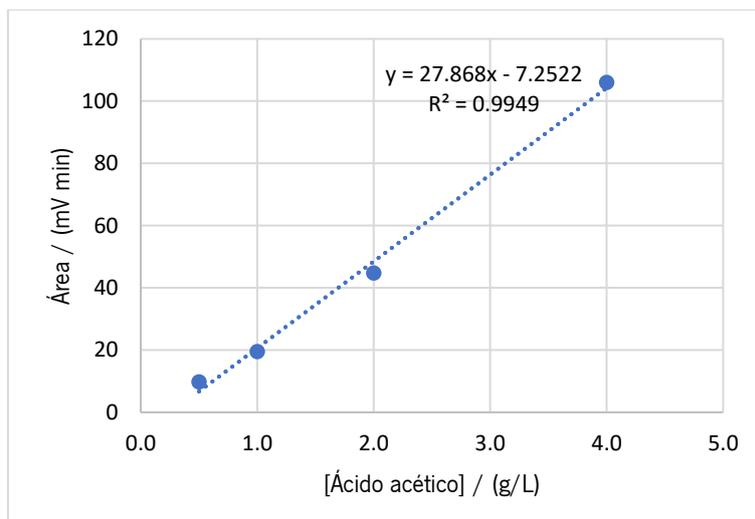


Figura C-7: Curva de calibração do ácido láctico.

Limites de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção foram calculados segundo a Equação C.1.

$$x_{LOD} = 3,8 \times \frac{S_{y,x}}{b} \sqrt{1,1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação C.1}$$

Onde  $x_{LOD}$  é o limite de detecção,  $S_{y,x}$  é o desvio padrão,  $b$  é o declive da curva de calibração,  $\bar{x}$  é a média dos valores e  $x_i$  é o valor do analito no ponto  $i$  da curva de calibração.

O valor do limite de quantificação foi calculado segundo a Equação C.2.

$$x_{LOQ} = 3.3 \times x_{LOD} \quad \text{Equação C.2}$$

Onde  $x_{LOQ}$  é o limite de quantificação.

Na Tabela C-2: Limites de quantificação e de detecção para a primeira curva de calibração estão representados os limites de quantificação e de detecção calculados para a primeira curva de calibração de cada composto.

Tabela C-2: Limites de quantificação e de detecção para a primeira curva de calibração

	Limite de detecção g/L	Limite de quantificação g/L
Sacarose	1,29	4,26
Glucose	0,49	1,62
Frutose	0,28	0,93
Etanol	0,76	2,51
Ácido cítrico	0,61	2,03
Ácido láctico	0,63	2,07
Ácido acético	0,60	1,99

## Segunda curva de calibração

Tempo de retenção

Os seguintes tempos de retenção foram usados para a detecção de açúcares, ácidos orgânicos e um álcool para eluente 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com um caudal de 0,05 mL/min a uma temperatura de 25 °C.

Tabela C-3: Tempos de retenção da segunda curva de calibração de HPLC

Composto	Tempo de retenção min
Sacarose	8,76
Glucose	10,37
Frutose	11,41
Etanol	24,42
Ácido cítrico	9,48
Ácido láctico	14,878
Ácido acético	18,10

Curva de calibração

As curvas de calibração a seguir apresentadas foram obtidas através da concentração do composto em função da área obtida para o pico no tempo de retenção acima referido.

Para obter uma curva de calibração recomenda-se que se use pelo menos quatro pontos, porém a análise do quarto ponto, que corresponderia à concentração mais alta não foi efetuada corretamente, por isso não estar constado no gráfico.

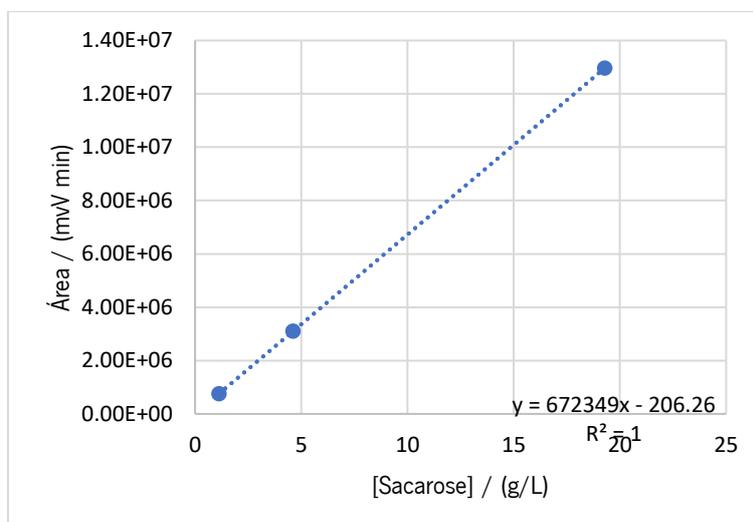


Figura C-8: Curva de calibração da sacarose.

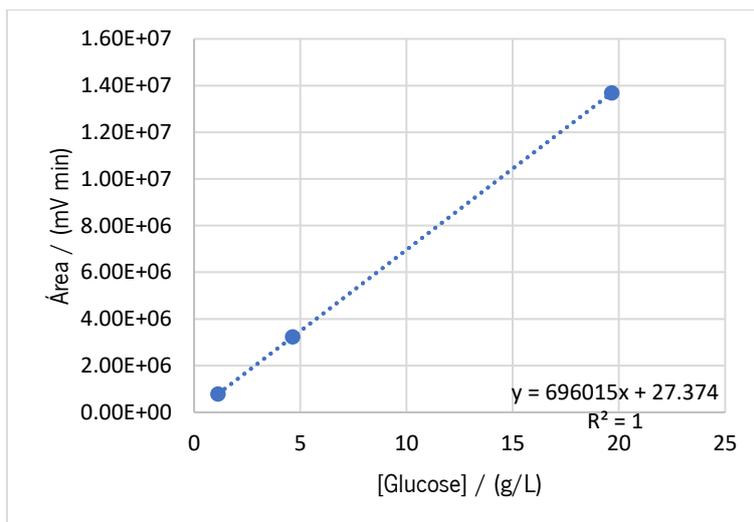


Figura C-9: Curva de calibração da glucose.

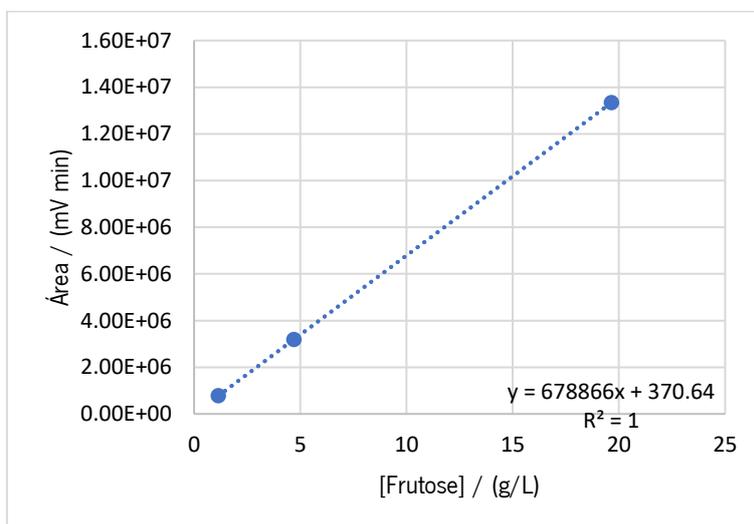


Figura C-10: Curva de calibração da frutose.

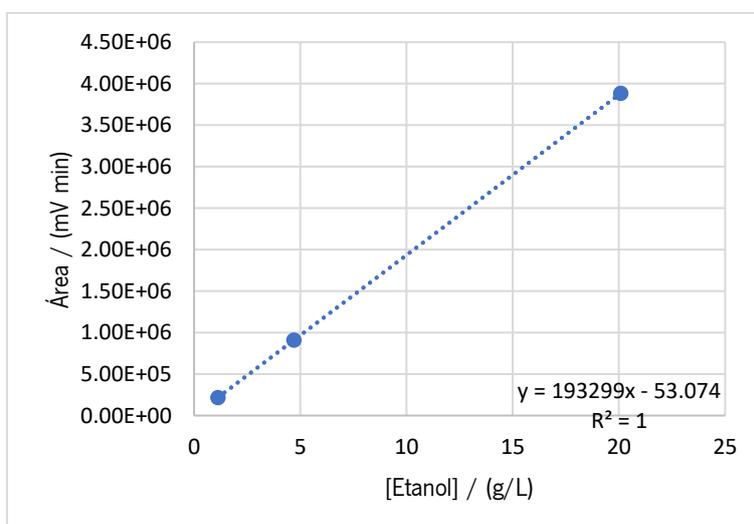


Figura C-11: Curva de calibração do etanol.

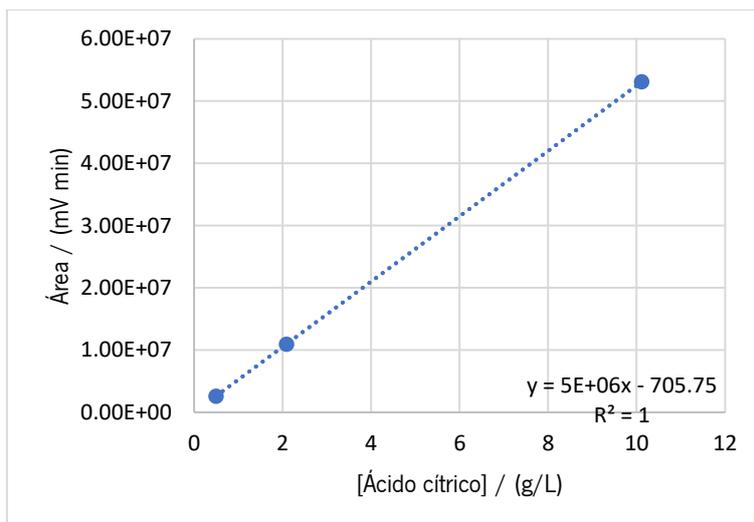


Figura C-12: Curva de calibração do ácido cítrico.

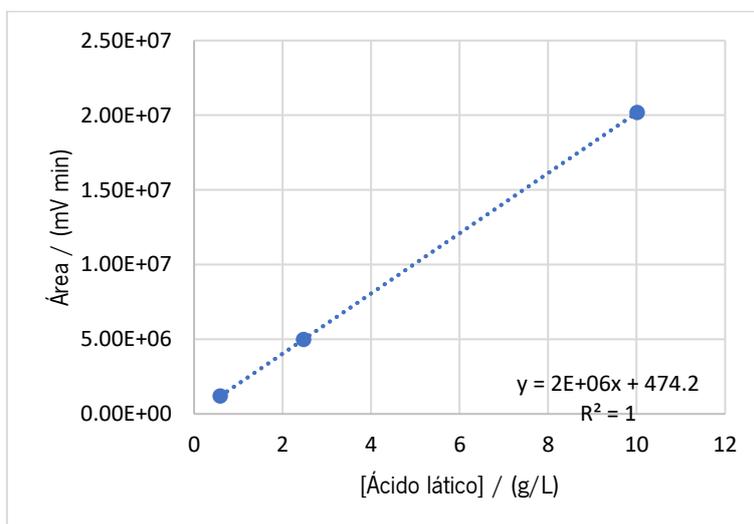


Figura C-13: Curva de calibração do ácido láctico.

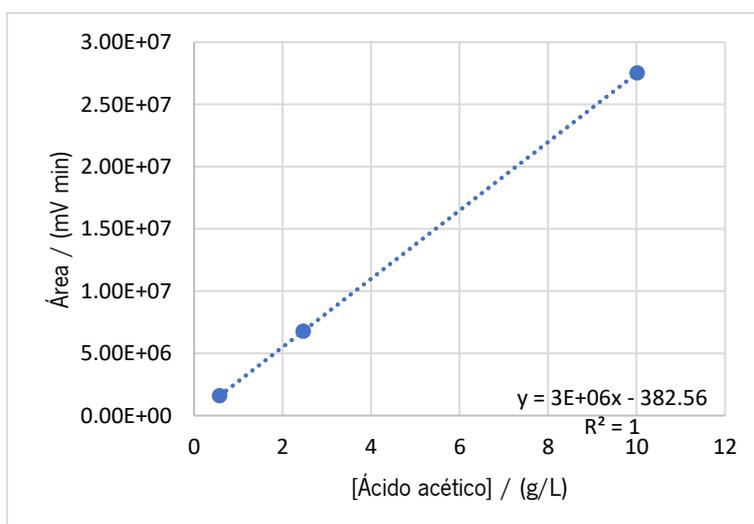


Figura C-14: Curva de calibração do ácido acético.

Limites de detecção e limite de quantificação

Na Tabela C-4 Tabela C-2: Limites de quantificação e de detecção para a primeira curva de calibração estão representados os limites de quantificação e de detecção calculados para a segunda curva de calibração de cada composto.

*Tabela C-4: Limites de quantificação e de detecção para a segunda curva de calibração.*

	Limite de detecção g/L	Limite de quantificação g/L
Sacarose	0,001	0,003
Glucose	0,002	0,007
Frutose	0,001	0,002
Etanol	0,002	0,007
Ácido cítrico	0,0001	0,0002
Ácido láctico	0,0002	0,001
Ácido acético	0,002	0,006

## Anexo D. Questionário da Análise sensorial

Código da amostra: \_\_\_\_

### Prova Sensorial

Este questionário insere-se num trabalho de investigação para o desenvolvimento de um sumo de maçã a decorrer no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

Todos os anos, toneladas de frutas e vegetais são desperdiçadas por não se enquadrarem nos padrões definidos. Os sumos que irá provar tencionam reduzir esse desperdício.

O questionário é anónimo e a sua resposta é confidencial. Classifique a amostra apresentada, atribuindo uma pontuação entre 1 (desgosto extremamente) a 5 (gosto extremamente) a cada um dos seguintes atributos, consoante a sua opinião.

Sexo: F  M

Idade: <20  20-30  30-40  40-50  >50

Aspeto Geral								
1		2		3		4		5

Cor								
1		2		3		4		5

Aroma								
1		2		3		4		5

Sabor								
1		2		3		4		5

Doçura								
1		2		3		4		5

Acidez/Sabor acético								
1		2		3		4		5

Apreciação global								
1		2		3		4		5

Observações:

---

---

---

Obrigada pela colaboração!

Ana Mangerona

Figura D-1: Questionário da Prova Sensorial.

## Anexo E. Resultados das provas sensoriais

### Sumo de maçã da variedade Fuji fermentado

Tabela E-1: Resultados das provas sensoriais para o sumo fermentado da maçã Fuji

	Aspeto Geral	Cor	Aroma	Sabor	Doçura	Acidez/Sabor acético	Apreciação Global
1	3	4	2	2	2	4	2
2	1	1	1	1	1	1	1
3	4	4	2	2	3	4	2
4	4	4	4	3	3	4	4
5	2	3	1	2	2	2	2
6	4	4	3	3	3	3	3
7	3	3	3	2	2	3	2
8	3	3	2	2	2	3	2
9	3	2	2	3	4	4	4
10	2	2	2	2	2	2	2
11	3	3	4	3	2	5	3
12	4	4	1	1	1	5	1
13	4	4	1	2	1	4	4
14	2	2	4	1	1	5	2
15	4	4	2	2	2	2	2
16	4	4	3	2	2	2	3
17	4	3	4	3	3	4	3
18	4	4	5	2	2	4	3
19	2	2	1	2	2	1	1
20	4	4	2	3	2	2	3
21	3	4	2	2	1	2	2
22	1	2	2	1	2	3	2
23	2	2	4	1	1	1	1
24	4	4	4	3	2	2	3
25	3	2	4	3	2	3	3
26	2	2	1	2	2	2	2
27	3	3	3	2	1	5	3
28	3	3	2	2	2	4	2
29	4	4	2	2	3	3	3
30	3	3	4	4	3	4	4
Média	3.07	3.10	2.57	2.17	2.03	3.10	2.47

## Sumo de maçã da variedade Fuji não fermentado

Tabela E-2: Resultados das provas sensoriais para o sumo não fermentado da maçã Fuji

	Aspeto Geral	Cor	Aroma	Sabor	Doçura	Acidez/Sabor acético	Apreciação Global
1	4	4	4	4	3	2	4
2	2	1	2	3	2	5	2
3	3	2	2	4	4	2	4
4	3	2	2	3	3	2	3
5	3	3	5	3	4	4	4
6	4	4	3	3	4	2	3
7	4	5	3	4	4	4	4
8	5	5	5	5	4	1	4
9	3	4	3	3	3	3	3
10	5	5	5	5	5	5	5
11	3	2	3	5	4	1	5
12	4	2	4	4	4	2	4
13	4	4	5	3	2	3	3
14	5	4	3	4	5	2	4
15	4	3	4	5	4	5	5
16	4	4	3	5	3	3	5
17	4	4	2	3	5	1	4
18	3	3	2	4	5	2	4
19	4	3	4	4	3	2	4
20	2	3	2	3	3	4	3
21	4	4	3	5	4	4	4
22	4	3	4	4	4	4	4
23	3	4	3	2	2	4	3
24	2	3	1	3	4	1	2
25	3	4	3	3	4	2	3
26	4	4	4	4	4	1	4
27	4	4	3	5	5	1	4
28	5	5	4	4	4	2	4
29	3	4	4	5	4	4	4
30	2	2	2	4	4	5	4
Média	3.57	3.47	3.23	3.87	3.77	2.77	3.77

## Sumo de maçã da variedade Golden Delicious fermentado

Tabela E-3: Resultados das provas sensoriais para o sumo fermentado da maçã Golden Delicious

	Aspeto Geral	Cor	Aroma	Sabor	Doçura	Acidez/Sabor acético	Apreciação Global
1	2	2	2	2	5	1	2
2	2	5	4	2	2	2	2
3	4	4	2	2	3	4	3
4	3	4	3	3	3	4	3
5	4	4	2	4	3	2	3
6	4	3	3	2	3	4	3
7	3	3	2	3	3	2	2
8	4	4	4	3	2	4	3
9	3	3	2	3	4	2	3
10	3	2	2	2	2	2	2
11	4	3	4	3	4	2	4
12	3	3	3	3	3	3	3
13	4	3	1	4	3	5	3
14	1	2	4	3	3	4	2
15	4	4	1	1	1	5	1
16	3	3	2	4	4	2	4
17	3	3	4	3	4	4	3
18	4	4	3	3	2	3	3
19	3	2	4	4	4	4	4
20	4	3	3	4	3	2	4
21	3	3	2	1	2	1	2
22	3	3	4	4	4	3	3
23	4	4	2	1	1	2	2
24	4	4	2	3	2	2	3
25	2	2	4	3	3	4	3
26	3	4	2	3	3	4	3
27	3	3	2	2	2	4	3
28	2	3	3	3	2	4	3
29	4	4	2	2	3	2	3
30	4	4	3	3	3	2	3
Média	3.23	3.27	2.70	2.77	2.87	2.97	2.83

## Sumo de maçã da variedade Golden Delicious não fermentado

Tabela E-4: Resultados das provas sensoriais para o sumo não fermentado da maçã Golden Delicious

	Aspeto Geral	Cor	Aroma	Sabor	Doçura	Acidez/Sabor acético	Apreciação Global
1	3	3	4	4	3	2	4
2	1	1	3	4	4	5	3
3	1	1	2	4	4	4	4
4	4	3	4	4	4	2	4
5	3	4	5	4	4	5	4
6	4	4	3	4	4	3	4
7	4	4	5	4	5	5	4
8	4	5	5	5	5	5	5
9	4	4	4	4	3	3	4
10	4	3	3	3	3	3	3
11	3	4	4	5	5	1	5
12	1	1	2	4	4	2	3
13	1	2	2	4	5	2	3
14	3	2	4	4	4	3	4
15	2	2	4	4	4	3	4
16	1	1	3	2	2	3	2
17	3	3	2	3	5	1	4
18	3	3	2	4	5	1	4
19	4	3	5	2	5	2	2
20	2	1	2	3	3	4	3
21	3	2	4	4	4	5	4
22	3	2	4	3	3	4	3
23	3	4	2	3	4	4	4
24	2	2	2	2	3	2	2
25	4	4	2	3	2	3	3
26	3	4	3	4	4	2	4
27	4	4	3	4	5	1	4
28	4	4	4	4	5	2	4
29	2	2	5	4	4	5	4
30	2	2	4	3	4	4	3
Média	2.83	2.80	3.37	3.63	3.97	3.03	3.60

## Sumo de maçã da variedade Royal Gala fermentado

Tabela E-5: Resultados das provas sensoriais para o sumo fermentado da maçã Royal Gala

	Aspeto Geral	Cor	Aroma	Sabor	Doçura	Acidez/Sabor acético	Apreciação Global
1	3	3	2	2	2	4	2
2	3	2	2	1	1	1	1
3	4	4	1	3	3	3	3
4	3	3	3	3	3	4	3
5	3	4	2	2	3	1	2
6	3	4	2	3	4	3	3
7	3	3	2	3	2	3	2
8	3	2	4	4	3	4	4
9	3	3	2	2	2	2	2
10	4	4	3	3	3	3	3
11	4	4	3	3	2	4	3
12	4	4	3	2	2	4	2
13	4	3	4	4	2	4	4
14	3	2	2	2	2	5	2
15	2	2	3	2	2	4	2
16	3	3	2	2	3	2	2
17	3	3	3	3	3	4	2
18	4	4	3	2	1	4	2
19	4	3	2	3	4	2	4
20	4	4	3	2	2	2	2
21	3	4	2	1	1	1	2
22	3	3	3	2	3	2	3
23	2	2	3	1	1	1	1
24	3	2	2	3	2	1	3
25	2	2	3	2	2	2	2
26	2	2	1	1	1	4	2
27	3	3	3	2	1	1	2
28	3	3	4	4	3	3	3
29	4	4	2	2	3	2	2
30	3	3	3	3	3	1	3
Média	3.17	3.07	2.57	2.40	2.30	2.70	2.43

## Sumo de maçã da variedade Royal Gala não fermentado

Tabela E-6: Resultados das provas sensoriais para o sumo não fermentado da maçã Royal Gala

	Aspeto Geral	Cor	Aroma	Sabor	Doçura	Acidez/Sabor acético	Apreciação Global
1	3	3	4	3	3	2	3
2	3	3	2	4	4	3	4
3	4	5	3	4	4	3	4
4	4	4	4	4	4	2	4
5	4	4	4	4	4	4	4
6	4	4	4	4	4	3	4
7	3	3	4	5	5	5	4
8	3	3	5	3	4	4	3
9	4	4	4	4	4	4	4
10	4	4	4	4	3	3	4
11	4	3	5	4	4	1	4
12	3	3	3	3	3	3	3
13	4	5	3	4	5	1	4
14	4	4	3	4	4	2	4
15	4	4	4	5	4	4	5
16	2	2	4	3	2	3	2
17	4	4	3	4	4	1	4
18	3	3	2	4	5	1	3
19	3	3	4	2	4	2	2
20	3	3	3	4	4	4	4
21	4	3	4	4	4	5	4
22	4	4	4	4	4	4	4
23	2	1	4	3	3	5	4
24	2	2	3	4	3	2	3
25	4	3	4	4	4	2	4
26	4	3	4	4	4	2	4
27	3	3	4	5	5	1	4
28	5	4	4	5	5	2	5
29	4	3	5	5	4	5	4
30	3	3	3	4	4	4	3
Média	3.50	3.33	3.70	3.93	3.93	2.90	3.73