

Desenvolvimento de vinagres a partir de chás e infusões

Sara Patrícia Ferreira Carvalho

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com
Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar
com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Lisboa, 2016

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com o apoio e contribuição de diversas pessoas. Muito obrigada:

À Professora Doutora Catarina Prista, por toda a orientação, apoio e conhecimentos que me transmitiu ao longo da realização deste trabalho. O seu saber e espírito pragmático foram cruciais durante todo o processo.

À Professora Doutora Maria da Conceição Loureiro Dias, por toda a sua contribuição.

Ao Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira, pela disponibilidade e companheirismo demonstrado ao longo dos anos.

À Engenheira Ana Carla Silva, por toda a ajuda dada com os processos de PCR.

À Professora Doutora Margarida Moldão Martins, pela transmissão de conhecimentos e orientação dada ao longo do meu percurso académico nesta instituição.

Aos meus colegas de Laboratório, Andreia Mósca, Daniel Costa, David Pires, Inês Macieira, Inês Valada, Mafalda Santos (especialmente pelo apoio dado durante a fase de PCR e pelo fornecimento de kombucha), Rafaela Santos e Sara Gomes, grandes companheiros ao longo desta aventura, sempre disponíveis para ajudar e dar conselhos, para me animar e fazer rir e até para conversas extremamente aleatórias.

Ao Ricardo Chagas e ao Alex, por toda a disponibilidade que demonstraram durante o período de tempo em que estive a utilizar o equipamento de HPLC.

À minha família mais chegada, ao meu namorado e à Rosalina, muito obrigado por tudo.

Resumo

O desenvolvimento constante de novos produtos é um factor fundamental para o sucesso da indústria alimentar.

Tanto o chá como o vinagre são produtos de utilização milenar por parte da humanidade, tendo o consumo de ambos reconhecidas propriedades benéficas para o bom funcionamento do organismo humano.

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver e otimizar vinagres a partir de diferentes chás com sacarose, com o intuito de se obter um produto simultaneamente inovador e tradicional.

Com este objectivo, fizeram-se ensaios preliminares com chá preto como matéria-prima inicial e diferentes concentrações de sacarose (8, 10 e 12%). Seguiu-se a avaliação da estirpe de levedura a utilizar para a fermentação alcoólica que ocorre numa fase primordial da produção de vinagre, com testes de fermentação a uma levedura vínica ISA1000 e a uma levedura imobilizada ProElif (Proenol). Foram retiradas amostras para análise por HPLC, para determinação de glucose, frutose e etanol. Após a escolha da levedura imobilizada ProElif (Proenol), produziram-se diversas bebidas alcoólicas a partir de chá preto, verde e branco. A este processo seguiu-se a inoculação do líquido fermentado com duas culturas distintas: mãe de vinagre e kombucha. Verificou-se a evolução da composição do produto obtido ao longo do tempo por HPLC, nomeadamente o seu teor em etanol e ácido acético. Identificou-se o microbioma do produto final por isolamento em placa seguido de PCR usando *primers* específicos para a região 16rRNA seguida de sequenciação e análise BLAST.

A análise sensorial efetuada permitiu ainda concluir que os vinagres obtidos a partir da base de chá com ambos os tipos de inóculo apresentaram características sensoriais agradáveis aos consumidores, que declararam a intenção de compra, podendo por isso considerar-se produtos com potencial de comercialização futura.

Palavras-chave: vinagre, chá, kombucha, produtos alimentares inovadores, bactérias acéticas.

Abstract

The continuous development of new products is a key-factor for the success of Food Industry.

Tea and vinegar are millenary products used by Humankind since immemorial times and their consumption is well recognized for its beneficial properties to human body functioning.

In the present work, we aim to develop and fine-tune vinegars produced from different varieties of tea, in order to obtain a new product simultaneously innovative and traditional.

With this objective, we first used black tea as raw material added of saccharose to final concentrations of 8, 10 and 12%, with the aim of choosing the best saccharose concentration. We also tested the most efficient kind of yeast to be used for the alcoholic fermentation step, the initial step of vinegar production, using both a suspension of the wine strain *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000 and an immobilized yeast ProElif (Proenol). We collected samples along the alcoholic fermentation process in order to evaluate the consumption of glucose and fructose and the production of ethanol.

After selecting the most adequate yeast (ProElif) we produced several alcoholic fermented beverages from black, green and white tea that were inoculated with two different cultures: “mother of vinegar” and “mother of kombucha”. The fermentation proceeded until no alcohol was detected. Metabolism was followed by HPLC analysis of the supernatant, in particular the concentrations of alcohol and acetic acid.

The microbiome present at the end of vinegar production was determined by PCR using specific primers for 16rRNA regions and sequencing followed by BLAST comparison.

A sensorial analysis using a non-trained consumers panel demonstrated that vinegars obtained with “vinegar mother” and “kombucha mother” presented pleasant sensorial characteristics for consumers, with an intention to buy that was equal or slightly higher than regular wine vinegar, showing the high commercial potential of the new developed products.

Key-words: vinegar, tea, kombucha, innovative food products, acetic acid bacteria.

Índice

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | i |
| Resumo | ii |
| Abstract | iii |
| Lista de quadros e tabelas | vi |
| Lista de figuras | vii |
| Lista de abreviaturas..... | viii |
| 1 – Introdução e Objectivos | 1 |
| 2 – Revisão bibliográfica..... | 2 |
| 2.1 – Desenvolvimento de novos produtos | 2 |
| 2.2 – O chá | 6 |
| 2.2.1 – Introdução..... | 6 |
| 2.2.2 – Composição bioquímica do chá | 7 |
| 2.2.3 – Morfologia da planta do chá..... | 10 |
| 2.2.3 – Produção de chá..... | 10 |
| 2.3 –Kombucha | 15 |
| 2.3.1 - Introdução..... | 15 |
| 2.3.2 – Benefícios do consumo de kombucha..... | 15 |
| 2.3.3 – Processo de produção de kombucha | 15 |
| 2.3.4 - Caracterização microbiológica e química da kombucha..... | 16 |
| 2.4 – O vinagre..... | 17 |
| 2.4.1 - Introdução..... | 17 |
| 2.4.2 – Utilização e benefícios do vinagre..... | 18 |
| 2.4.3 - Métodos de produção | 18 |
| 2.5 – Microrganismos envolvidos na produção de vinagre | 21 |
| 2.5.1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 21 |
| 2.5.2 - Bactérias acéticas..... | 27 |
| 2.5.3 – Métodos de identificação de microrganismos..... | 28 |
| 2.6 – Análise Sensorial..... | 30 |
| 2.6.1 – Princípios da Análise Sensorial..... | 30 |
| 2.6.2 – Condução de um teste sensorial..... | 32 |
| 3. Material e métodos | 36 |
| 3.1 - Microrganismos e meios de cultura | 36 |

| | |
|--|----|
| 3.2 – Preparação de vinagre | 36 |
| 3.2.1 - Preparação dos chás | 36 |
| 3.2.2 - Preparação de kombucha..... | 36 |
| 3.2.3. – Preparação do inóculo | 37 |
| 3.2.3 - Fermentação do chá | 37 |
| 3.2.4 - Preparação do vinagre..... | 38 |
| 3.2.5 - Recolha de amostras..... | 39 |
| 3.3 - Métodos analíticos – HPLC | 39 |
| 3.3.1.- Preparação do eluente..... | 39 |
| 3.3.2 - Preparação das amostras..... | 39 |
| 3.3.3 - Curvas de calibração | 40 |
| 3.3.4 – HPLC | 41 |
| 3.3.5 – Determinação do pH | 41 |
| 3.4 - Métodos moleculares | 42 |
| 3.4.1 – Isolamento de microrganismos presentes no vinagre..... | 42 |
| 3.4.2 – PCR..... | 42 |
| 3.5 – Análise Sensorial..... | 43 |
| 4 - Resultados e discussão | 45 |
| 4.1 – Ensaio de fermentação alcoólica | 45 |
| 4.1.1. Comparação entre levedura imobilizada e não imobilizada..... | 45 |
| 4.1.2. Efeito da esterilização versus pasteurização do chá | 53 |
| 4.2 – Ensaio para avaliação do processo de produção de vinagres | 55 |
| 4.2.1. Avaliação sensorial primária..... | 56 |
| 4.2.2 - Análise Composição Química por HPLC..... | 57 |
| 4.2.3. Evolução do pH..... | 63 |
| 4.3. - Identificação da microbiota do vinagre de chá..... | 64 |
| 4.4. – Análise sensorial - avaliação da preferência do consumidor..... | 65 |
| 5 – Considerações finais e perspectivas de futuro | 70 |
| 6 – Bibliografia | 72 |
| Anexos | 77 |
| Anexo 1..... | 78 |
| Anexo 2..... | 79 |
| Curvas de calibração | 79 |
| Anexo 3..... | 81 |
| Anexo 4..... | 83 |

Lista de quadros e tabelas

| | |
|--|----|
| QUADRO 1 - EXEMPLOS DE NOVOS PRODUTOS (ADAPTADO DE FULLER, 2011)..... | 3 |
| FIGURA 1 - FASES DE DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS | 4 |
| TABELA 1 - MAIORES PRODUTORES DE CHÁ EM 2013. (ADAPTADO DE FAO 2015)..... | 7 |
| TABELA 2 - MAIORES EXPORTADORES DE CHÁ EM 2013. (ADAPTADO DE FAO, 2015) | 7 |
| TABELA 3 - CATEQUINAS NO CHÁ (ADAPTADO DE KUMAR <i>ET AL.</i> , 2013)..... | 8 |
| TABELA 4 –TEAFLAVINAS (ADAPTADO DE OBANDA <i>ET AL.</i> , 1997) | 8 |
| FIGURA 2 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CHÁ PRETO CRUSH TEAR CURL (ADAPTADO DE KUMAR <i>ET AL.</i> <i>IN</i> PREEDY, 2013)..... | 11 |
| FIGURA 3 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CHÁ VERDE (ADAPTADO DE AHMED E STEPPINPREEDY, 2013) | 13 |
| FIGURA 4 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CHÁ BRANCO (ADAPTADO DE MAOINPREEDY, 2013) | 14 |
| TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (ADAPTADO DE HTTPS://MICROBEWIKI.KENYON.EDU/INDEX.PHP/SACCHAROMYCES_CEREVISIAE) | 22 |
| FIGURA 5 - PROCESSO DE GLICÓLISE FONTE: WWW.SCIELO.BR/SCIELO.PHP?SCRIPT=SCI_ARTTEXT&PID=S0100-40422000000200018 | 24 |
| FIGURA 6 – VIAS METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR <i>S. CEREVISIAE</i> (CIANI <i>ET AL.</i> , 2016)..... | 26 |
| QUADRO 2 - APLICAÇÕES PRÁTICAS DA ANÁLISE SENSORIAL..... | 32 |
| TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DE CHÁ POR FRASCOS (BEBIDA PASTEURIZADA) | 37 |
| TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DE CHÁ POR FRASCOS (BEBIDA ESTERILIZADA)..... | 38 |
| FIGURA 7 - EQUIPAMENTO DE IMERSÃO COM AGITAÇÃO | 38 |
| FIGURA 8 - VIAL (WATERS)..... | 40 |
| FIGURA 9 - SERINGA HIPODÉRMICA E FILTRO | 40 |
| TABELA 4 - CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA A OBTENÇÃO DE CURVAS DE CALIBRAÇÃO | 41 |
| FIGURA 10 - CHÁ AÇUCARADO INOCULADO COM LEVEDURA IMOBILIZADA PROÉLIF | 45 |
| FIGURA 11 - CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS AO LONGO DE FERMENTAÇÃO DE CHÁ INOCULADO COM LEVEDURA IMOBILIZADA. (A)8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL | 47 |
| FIGURA 12 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA AS AMOSTRAS AO DIA 14 DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM LEVEDURA IMOBILIZADA. (A)8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL. | 48 |
| FIGURA 13 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO AO LONGO DA FERMENTAÇÃO DE CHÁ INOCULADO COM LEVEDURA IMOBILIZADAS. (A) 8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL..... | 49 |
| FIGURA 14 - CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS AO LONGO DE FERMENTAÇÃO DE CHÁ INOCULADO COM <i>S. CEREVISIAE</i> ISA1000 EM SUSPENSÃO. (A) 8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL..... | 51 |
| FIGURA 15 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO AO LONGO DA FERMENTAÇÃO DE CHÁ INOCULADO COM <i>S. CEREVISIAE</i> ISA1000 EM SUSPENSÃO. (A) 8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL..... | 52 |
| FIGURA 16 – COMPOSIÇÃO NO FINAL DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DE CHÁ FERMENTADO COM LEVEDURA ISA1000 E LEVEDURA IMOBILIZADA PROÉLIF NAS VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE INICIAL USADAS. | 53 |
| FIGURA 17 - COMPOSIÇÃO FINAL DE CHÁS PASTEURIZADO E ESTERILIZADO FERMENTADOS COM <i>S.</i> <i>CEREVISIAE</i> ISA1000..... | 54 |
| FIGURA 18 - COMPOSIÇÃO FINAL DE CHÁS PASTEURIZADO E ESTERILIZADO FERMENTADOS COM LEVEDURA IMOBILIZADA | 54 |
| TABELA 5 - AVALIAÇÃO SENSORIAL PRIMÁRIA | 56 |
| FIGURA 19– CHÁ FERMENTADO INOCULADO COM MÃE DE VINAGRE..... | 57 |
| FIGURA 20 - CHÁ FERMENTADO INOCULADO COM MÃE DE KOMBUCHA..... | 57 |
| FIGURA 21 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO AO LONGO DA OXIDAÇÃO ACÉTICA DE CHÁ PRETO FERMENTADO COM LEVEDURA IMOBILIZADA E INOCULADO COM MÃE DO VINAGRE. (A)8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL. | 58 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 22 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO AO LONGO DA OXIDAÇÃO ACÉTICA DE CHÁ PRETO FERMENTADO COM LEVEDURA IMOBILIZADA E INOCULADO COM MÃE DA KOMBUCHA. (A) 8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL. | 60 |
| FIGURA 23 - CONCENTRAÇÃO FINAL DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO EM VINAGRE E VINAGRE DE KOMBUCHA DE CHÁ PRETO | 61 |
| FIGURA 24 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO AO FIM DE 10 DIAS DE OXIDAÇÃO EM VINAGRES DE CHÁ PRETO, VERDE E BRANCO | 62 |
| TABELA 6 - VINAGRES PRODUZIDOS E SEUS VALORES DE PH..... | 63 |
| FIGURA 25 - ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE REALIZADA AO PRODUTO DE PCR | 64 |
| QUADRO 7 - VINAGRES SELECIONADOS PARA ANÁLISE SENSORIAL | 65 |
| FIGURA 26 - GÉNERO DO PAINEL DE PROVADORES | 66 |
| FIGURA 27 - COMPOSIÇÃO ETÁRIA DO PAINEL DE PROVADORES | |
| FIGURA 28 - AMOSTRAS DE VINAGRE A283 E A739 | 66 |
| FIGURA 29 - AVALIAÇÃO DAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS | 67 |
| FIGURA 30 - APRECIACÃO GLOBAL..... | 68 |
| QUADRO 8 - CORRESPONDÊNCIA ENTRE INTENÇÃO DE COMPRA E VALOR ESTIPULADO | 68 |
| FIGURA 31 - INTENÇÃO DE COMPRA DOS PRODUTOS..... | 69 |
| FIGURA 32 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A GLUCOSE | 79 |
| FIGURA 33 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A FRUTOSE..... | 79 |
| FIGURA 34 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O ETANOL | 80 |
| FIGURA 35 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O ÁCIDO ACÉTICO | 80 |
| FIGURA 36 – SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA DOIS DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS ACÉTICAS OBTIDOS A PARTIR DE VINAGRE PRODUZIDO COM A MÃE DA KOMBUCHA (3BAC5) E COM A MÃE DO VINAGRE (3BAC8) | 82 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| QUADRO 1 - EXEMPLOS DE NOVOS PRODUTOS (ADAPTADO DE FULLER, 2011)..... | 3 |
| FIGURA 1 - FASES DE DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS | 4 |
| TABELA 1 - MAIORES PRODUTORES DE CHÁ EM 2013. (ADAPTADO DE FAO 2015)..... | 7 |
| TABELA 2 - MAIORES EXPORTADORES DE CHÁ EM 2013. (ADAPTADO DE FAO, 2015) | 7 |
| TABELA 3 - CATEQUINAS NO CHÁ (ADAPTADO DE KUMAR <i>ET AL.</i> , 2013)..... | 8 |
| TABELA 4 –TEAFLAVINAS (ADAPTADO DE OBANDA <i>ET AL.</i> , 1997) | 8 |
| FIGURA 2 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CHÁ PRETO CRUSH TEAR CURL (ADAPTADO DE KUMAR <i>ET AL.</i> <i>IN</i> PREEDY, 2013)..... | 11 |
| FIGURA 3 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CHÁ VERDE (ADAPTADO DE AHMED E STEPPINPREEDY, 2013) | 13 |
| FIGURA 4 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CHÁ BRANCO (ADAPTADO DE MAOINPREEDY, 2013) | 14 |
| TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (ADAPTADO DE HTTPS://MICROBEWIKI.KENYON.EDU/INDEX.PHP/SACCHAROMYCES_CEREVISIAE) | 22 |
| FIGURA 5 - PROCESSO DE GLICÓLISE FONTE: WWW.SCIELO.BR/SCIELO.PHP?SCRIPT=SCI_ARTTEXT&PID=S0100-4042200000200018 | 24 |
| FIGURA 6 – VIAS METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR <i>S. CEREVISIAE</i> (CIANI <i>ET AL.</i> , 2016) | 26 |
| QUADRO 2 - APLICAÇÕES PRÁTICAS DA ANÁLISE SENSORIAL..... | 32 |
| TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DE CHÁ POR FRASCOS (BEBIDA PASTEURIZADA) | 37 |
| TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DE CHÁ POR FRASCOS (BEBIDA ESTERILIZADA)..... | 38 |
| FIGURA 7 - EQUIPAMENTO DE IMERSÃO COM AGITAÇÃO | 38 |
| FIGURA 8 - VIAL (WATERS)..... | 40 |
| FIGURA 9 - SERINGA HIPODÉRMICA E FILTRO | 40 |
| TABELA 4 - CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA A OBTENÇÃO DE CURVAS DE CALIBRAÇÃO | 41 |
| FIGURA 10 - CHÁ AÇUCARADO INOCULADO COM LEVEDURA IMOBILIZADA PROÉLIF | 45 |
| FIGURA 11 - CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS AO LONGO DE FERMENTAÇÃO DE CHÁ INOCULADO COM LEVEDURA IMOBILIZADA. (A)8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL | 47 |
| FIGURA 12 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA AS AMOSTRAS AO DIA 14 DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM LEVEDURA IMOBILIZADA. (A)8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL. | 48 |
| FIGURA 13 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO AO LONGO DA FERMENTAÇÃO DE CHÁ INOCULADO COM LEVEDURA IMOBILIZADAS. (A) 8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL..... | 49 |
| FIGURA 14 - CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS AO LONGO DE FERMENTAÇÃO DE CHÁ INOCULADO COM <i>S. CEREVISIAE</i> ISA1000 EM SUSPENSÃO. (A) 8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL..... | 51 |
| FIGURA 15 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO AO LONGO DA FERMENTAÇÃO DE CHÁ INOCULADO COM <i>S. CEREVISIAE</i> ISA1000 EM SUSPENSÃO. (A) 8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL..... | 52 |
| FIGURA 16 – COMPOSIÇÃO NO FINAL DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE CHÁ FERMENTADO COM LEVEDURA ISA1000 E LEVEDURA IMOBILIZADA PROÉLIF NAS VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE INICIAL USADAS. | 53 |
| FIGURA 17 - COMPOSIÇÃO FINAL DE CHÁS PASTEURIZADO E ESTERILIZADO FERMENTADOS COM <i>S.</i> <i>CEREVISIAE</i> ISA1000..... | 54 |
| FIGURA 18 - COMPOSIÇÃO FINAL DE CHÁS PASTEURIZADO E ESTERILIZADO FERMENTADOS COM LEVEDURA IMOBILIZADA | 54 |
| TABELA 5 - AVALIAÇÃO SENSORIAL PRIMÁRIA | 56 |
| FIGURA 19– CHÁ FERMENTADO INOCULADO COM MÃE DE VINAGRE..... | 57 |
| FIGURA 20 - CHÁ FERMENTADO INOCULADO COM MÃE DE KOMBUCHA..... | 57 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 21 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO AO LONGO DA OXIDAÇÃO ACÉTICA DE CHÁ PRETO FERMENTADO COM LEVEDURA IMOBILIZADA E INOCULADO COM MÃE DO VINAGRE. (A)8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL. | 58 |
| FIGURA 22 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO AO LONGO DA OXIDAÇÃO ACÉTICA DE CHÁ PRETO FERMENTADO COM LEVEDURA IMOBILIZADA E INOCULADO COM MÃE DA KOMBUCHA. (A)8%, (B) 10% E (C) 12% SACAROSE INICIAL. | 60 |
| FIGURA 23 - CONCENTRAÇÃO FINAL DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO EM VINAGRE E VINAGRE DE KOMBUCHA DE CHÁ PRETO | 61 |
| FIGURA 24 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO AO FIM DE 10 DIAS DE OXIDAÇÃO EM VINAGRES DE CHÁ PRETO, VERDE E BRANCO | 62 |
| TABELA 6 - VINAGRES PRODUZIDOS E SEUS VALORES DE PH..... | 63 |
| FIGURA 25 - ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE REALIZADA AO PRODUTO DE PCR | 64 |
| QUADRO 7 - VINAGRES SELECIONADOS PARA ANÁLISE SENSORIAL | 65 |
| FIGURA 26 - GÉNERO DO PAINEL DE PROVADORES | 66 |
| FIGURA 27 - COMPOSIÇÃO ETÁRIA DO PAINEL DE PROVADORES | |
| FIGURA 28 - AMOSTRAS DE VINAGRE A283 E A739 | 66 |
| FIGURA 29 - AVALIAÇÃO DAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS | 67 |
| FIGURA 30 - APRECIÇÃO GLOBAL..... | 68 |
| QUADRO 8 - CORRESPONDÊNCIA ENTRE INTENÇÃO DE COMPRA E VALOR ESTIPULADO | 68 |
| FIGURA 31 - INTENÇÃO DE COMPRA DOS PRODUTOS..... | 69 |
| FIGURA 32 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A GLUCOSE | 79 |
| FIGURA 33 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A FRUTOSE..... | 79 |
| FIGURA 34 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O ETANOL | 80 |
| FIGURA 35 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O ÁCIDO ACÉTICO | 80 |
| FIGURA 36 – SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA DOIS DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS ACÉTICAS OBTIDOS A PARTIR DE VINAGRE PRODUZIDO COM A MÃE DA KOMBUCHA (3BAC5) E COM A MÃE DO VINAGRE (3BAC8) | 82 |

Lista de abreviaturas

AAB – Bactérias acéticas (Acetic Acid Bacteria)

Ác. - ácido

ADP –Adenosina difosfato

ATP – Adenosida trifosfato

Cél – célula

CTC – Crush Tear Curl

CVF – Compostos Voláteis de Flavor

DNA – Ácido dinucleótico (Dinucleotacid)

DNP – Desenvolvimento de Novos Produtos

DO – Densidade Óptica

EtOH – Etanol

Fru – frutose

GA3P – gliceraldeído 3-fosfato

Glu - glucose

GYC – Glucose-Extrato de Levedura -Carbonato de Cálcio

Imob - imobilizada

ISO – International Standard Organization

NAD⁺ – Nicotinamida Adenina Dinucleótido (estado oxidado)

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido (estado reduzido)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)

PQQ-ADH - álcool desidrogenase pirroloquinolina dependente da quinona

rpm – rotações por minuto

S. - *Saccharomyces*

sec. – Século

SSF – Solid State Fermentation

UV – Ultravioleta

1 – Introdução e Objectivos

Um novo produto é aquele que não foi previamente manufacturado por uma companhia e introduzido por essa companhia no seu mercado ou aquele que resulta da apresentação por uma companhia de um produto estabelecido numa outra forma ou num novo mercado não previamente explorado por essa companhia (Fuller, 2011).

O desenvolvimento de novos produtos alimentares é um factor fundamental para o sucesso da indústria alimentar, constituindo a base da sobrevivência da indústria alimentar e o seu desenvolvimento faz parte de uma estratégia necessária para uma empresa obter vantagem competitiva e sucesso financeiro a longo prazo. A inovação mantém o crescimento e aumenta a competitividade.

Dentro da estratégia de criação de produtos inovadores que têm vindo a ser desenvolvidos pelo mercado nacional destaca-se aquela que aposta no desenvolvimento de produtos inovadores com características específicas e apelativas quer ao nível sensorial quer funcional, muitos deles tendo por base técnicas ancestrais aplicadas a novas matérias primas.

Tanto o chá como o vinagre são produtos de utilização milenar por parte da humanidade, tendo o consumo de ambos reconhecidas propriedades benéficas para o bom funcionamento do organismo humano. Em relação a estas duas matérias primas, tem-se assistido nos últimos anos a um aumento crescente das variedades disponíveis no mercado. No entanto, não se conhece nenhum produto inovador no mercado nacional que alie as propriedades das duas matérias primas.

Os objectivos do presente trabalho foram produzir vinagres a partir de diferentes chás, com o intuito de se obter um produto simultaneamente inovador e tradicional, que aliasse as características antioxidantes do chá e outras propriedades benéficas para o consumidor, às características do vinagre. Procurou-se também produzir vinagres de chá utilizando inóculos provenientes de kombucha, um chá fermentado com reconhecidas propriedades benéficas para a saúde, cujo inóculo consiste numa associação simbiótica de leveduras e bactérias acéticas.

2 – Revisão bibliográfica

2.1 – Desenvolvimento de novos produtos

A definição de novo produto mais simples é produto que não foi previamente manufacturado por uma companhia e introduzido por essa companhia no seu mercado ou apresentação por uma companhia de um produto estabelecido numa outra forma ou num novo mercado não previamente explorado por essa companhia (Fuller, 2011).

Os novos produtos alimentares são a base da sobrevivência da indústria alimentar, uma vez que se as empresas dependessem apenas dos seus produtos antigos, deixariam de existir.

O desenvolvimento de novos produtos (DNP) faz parte de uma estratégia adequada para uma empresa obter vantagem competitiva e sucesso financeiro a longo prazo. A inovação mantém o crescimento e aumenta a competitividade (Costa e Jongen, 2006).

Desenvolvimentos sócio-económicos e tecnológicos ao longo das últimas décadas acionaram a necessidade de uma mudança na orientação da indústria agroalimentar, da produção para o mercado. Por um lado, houve uma diminuição da taxa de crescimento populacional, acompanhado de um aumento no rendimento disponível. Por outro, o desenvolvimento científico e tecnológico deu origem a uma produção e distribuição alimentar à escala mundial, tornando a provisão de alimentos sempre diversa, sempre em crescimento, quase sempre disponível em todo o lado.

Este desequilíbrio entre a oferta e a procura limitou a importância da disponibilidade e do preço como factores determinantes da compra de comida e aumentou a importância da escolha do consumidor. A própria natureza da escolha alimentar sofreu uma mudança devido a alterações significativas nos valores e no estilo de vida. As famílias são mais pequenas e constituídas por pessoas com grau de instrução superior. Simultaneamente, valores como qualidade de vida, bem estar e preocupação com o meio ambiente, ganharam importância. Políticas de saúde pública, ambiente e sustentabilidade também tentam influenciar a escolha do consumidor (Costa e Jongen, 2006).

Os consumidores ocidentais exigem também mais e melhor informação sobre os alimentos que consomem e a sua maneira de produção

Existem diversos tipos de novos produtos: extensão de linha (uma variante da linha estabelecida produtos, isto é, uma extensão lógica de uma família de produtos posicionados similarmente); reposicionamento de um produto existente (uma nova utilização para um produto existente; este tipo de produto requer um extensivo desenvolvimento de marketing); nova forma ou tamanho de produtos existentes; reformulação de um produto existente (pode ter diversas razões, como ir de encontro a tendências, lidar com escassez de matérias-primas, acesso a novas tecnologias, baixar custos, lidar com restrições legais); nova embalagem de um produto existente (uma ocorrência especialmente vulgar entre produtos hortofrutícolas, acrescentando-lhes valor); produtos inovadores (o desenvolvimento destes produtos é dispendioso e mais arriscado) e, por último, produtos criativos (nunca antes vistos) (Fuller, 2011). O quadro 1 resume a informação anterior, fornecendo exemplos:

Quadro 1 - Exemplos de novos produtos (adaptado de Fuller, 2011)

| Tipo de novo produto | Exemplo |
|---|---|
| Extensão de linha | novo sabor numa linha de água engarrafada |
| Reposicionamento de um produto existente | produto de aveia posicionado como factor de redução de colesterol |
| Nova forma de produto | fruta pré-descascada |
| Reformulação de um produto existente | lacticínios sem lactose |
| Nova embalagem de produto existente | produto em porções individuais |
| Produto inovador | refeições congeladas |
| Produto criativo | produto obtido por extrusão |

De acordo com Kotler (1997), o processo de DNP é constituído por 8 etapas (Figura 1).



Figura 1 - Fases de Desenvolvimento de novos produtos

A geração de ideias assenta numa constante procura de novas ideias de produtos, que podem ter origem em fontes internas ou externas (clientes, concorrentes, fornecedores) à empresa (Kotler, 2004). É comum a existência, em empresas de média e grande dimensão, de um departamento cuja função é justamente a I & D (Silva *et al.*, 2009). O departamento de marketing pode também contribuir para esta etapa, com estudos de mercado que consigam compreender as necessidades e exigências dos consumidores. É essencial que a empresa esteja atenta ao meio onde está inserida, com particular ênfase na sua concorrência. Os produtos de empresas oponentes são valiosas fontes de informação, que podem abrir novos horizontes para a empresa. A selecção de ideias consiste na avaliação das ideias obtidas e identificação das ideias que apresentam maior viabilidade (Kotler, 2004). Consideram-

se boas ideias de produtos as que respondem a uma necessidade ou desejo existentes, e que, em simultâneo, possam ser adoptadas pela empresa em termos dos seus recursos e capacidades (Silva *et al.*, 2009).

Após esta fase, segue-se o desenvolvimento do conceito de produto, que é, muito simplesmente uma versão mais detalhada da ideia previamente escolhida. A mesma ideia pode originar múltiplos conceitos de produtos, tendo em conta o público alvo, os benefícios associados ao produto e qual o contexto da utilização/ consumo do produto. Os diferentes conceitos devem ser analisados de modo a compreender qual o conceito que deve ser desenvolvido e posteriormente testado. Os testes devem determinar os benefícios do produto para o consumidor, se este fica satisfeito e se compraria o produto, se o preço é razoável. A fase de desenvolvimento e teste do conceito é de elevada importância, pois é a última oportunidade de se desistir de uma nova ideia sem se investir consideravelmente (Silva *et al.*, 2009).

A estratégia de marketing deve apresentar a descrição do mercado alvo, o posicionamento e preço do produto, a estimativa de vendas e quota de mercado, a distribuição do produto, orçamento do departamento de marketing e comercial, e, por fim, as margens do produto. Deste modo a empresa pode prever e controlar o negócio mais eficientemente, precavendo-se em relação a eventuais alterações que possam ter de ser realizadas no produto. A análise do negócio avalia a atractividade comercial da proposta, incluindo estudo de vendas, custos e projecções de lucros, de modo a conhecer se os objectivos da empresa são cumpridos.

O desenvolvimento do produto: o departamento de I&D pode desenvolver uma ou mais versões físicas do conceito de produto, até criar uma versão satisfatória - o protótipo. Este deve evidenciar os atributos chave do produto, ao mesmo tempo que respeita os parâmetros de segurança em vigor e os custos pré-definidos. Os testes de consumidores realizados ao protótipo devem ser feitos em ambiente real de mercado. Se os objectivos traçados forem alcançados, pode-se passar à fase final do processo de DNP: a comercialização. Neste ponto crítico, onde se efetuam os maiores gastos, deve conseguir-se responder a diversas perguntas, tais como quando deve o produto entrar no mercado, onde deve ser lançado e para quem é lançado. Sendo esta a etapa final do DNP, é a última oportunidade de corrigir algum erro ou situação menos correta. O cancelamento de um projeto nesta fase é uma ocorrência rara, em especial se o processo decorreu conforme o descrito anteriormente, pois deste modo os riscos são reduzidos.

2.2 – O chá

2.2.1 – Introdução

O chá preto é definido pela ISO 3720 como “chá derivado apenas e exclusivamente, e produzido por processos aceitáveis, como fermentação e secagem, a partir de folhas, rebentos e pecíolo de variedades da espécie *Camellia sinensis*, conhecida por ser apropriada para a produção de chá para consumo como bebida”.

O ato de beber chá é originário da China, desde há 3000 anos. Atualmente, encontra-se difundido um pouco por todo o mundo. É, depois da água, a segunda bebida mais consumida no planeta. Hoje em dia o chá é consumido por cerca de metade da população mundial (Saberri, 2010). Estima-se que por dia se consomem 2,5 biliões de chávenas de chá.

A cultura do chá foi difundida a partir da China, em primeiro lugar para países próximos: a Coreia e o Japão. Por via terrestre, através dos comerciantes árabes que percorriam a rota da seda, o chá atingiu o norte de África. Os portugueses e os ingleses ajudaram na sua difusão pela África Ocidental.

O chá foi trazido para o continente europeu em meados do séc. XVI, numa ação atribuída por alguns autores, a árabes, por outros autores, a holandeses. Apesar de terem sido os portugueses os primeiros europeus a contactar com chá, a atenção que despendiam às especiarias levou a um certo esquecimento da planta do chá. É no entanto de salientar uma portuguesa, a rainha D. Catarina de Bragança, casada com o rei Carlos II de Inglaterra, como a responsável pela introdução do hábito de beber chá neste país. Este hábito foi rapidamente adoptado pelo povo inglês, que o difundiu através do seu vasto império (Rosa, 2004).

Atualmente, os maiores produtores de chá distribuem-se geograficamente pela Ásia e África, como descrito na Tabela 1:

Tabela 1 - Maiores produtores de chá em 2013. (Adaptado de FAO 2015)

| País | Produção (milhares de toneladas) |
|------------------|---|
| China | 1924.5 |
| Índia | 1200.4 |
| Quênia | 436.3 |
| Sri Lanka | 343.1 |
| Turquia | 227.0 |

De modo semelhante, os maiores produtores de chá são também os países que exportam este bem em maior quantidade, como se pode verificar na Tabela 2:

Tabela 2 - Maiores exportadores de chá em 2013. (Adaptado de FAO, 2015)

| País | Exportação (milhares de toneladas) |
|------------------|---|
| Quênia | 415.9 |
| China | 329.7 |
| Sri Lanka | 311.0 |
| Índia | 209.2 |
| Vietname | 133.5 |

2.2.2 – Composição bioquímica do chá

Originalmente a planta do chá era cultivada para fins medicinais, mas ganhou popularidade pelo seu sabor agradável e efeito estimulante (Saberri, 2010). As folhas de chá apresentam na sua constituição diversos tipos de compostos, como:

- Hidratos de carbono
- Proteínas
- Aminoácidos
- Lípidos
- Polifenóis
- Cafeína
- Minerais

- Fibra
- Complementos de enzimas
- Compostos aromáticos

As folhas jovens de chá são ricas em compostos polifenólicos, sendo o maior grupo as catequinas. Estas são responsáveis pela formação dos pigmentos do chá preto e compreendem várias fracções:

Tabela 3 - Catequinas no chá (adaptado de Kumar *et al.*, 2013)

| |
|--|
| Fracções de catequinas |
| Catequinas simples (+C) |
| (-) - epicatequina (EC) |
| (-) - epicatequinagallate (ECG) |
| (-) - epigallocatequina (EGC) |
| (-) - epigallocatequinagallate (EGCG) |

Quanto aos pigmentos, as clorofilas e os carotenóides predominam. A clorofila de uma folha verde representa 0,2 – 0,5% do peso seco. A cor do produto final depende do padrão de degradação da clorofila. Os carotenóides são considerados precursores de compostos voláteis do chá preto, que se degradam durante a fermentação e a secagem. (Ravichandran, 2002)

As teaflavinas constituem 0,3 – 1,8% do peso seco da folha do chá, e formam-se através da polimerização de polifenóis durante a fermentação, catalisada pela polifenol oxidase. Podem ser:

Tabela 4 –Teaflavinas (adaptado de Obanda *et al.*, 1997)

| |
|---|
| Teaflavinas simples |
| Teaflavina - 3 - gallate |
| Teaflavina - 3' - gallate |
| Teaflavina – 3, 3' - digallate |
| Digallate equivalente de teaflavinas |
| Isoteaflavinas |
| Ácidos teaflávicos |

As teaflovinas são compostos vermelho alaranjados que dão força, vigor e cor do chá.

As tearrubinas são compostos castanho avermelhados que perfazem cerca de 10-20% do peso seco do chá e contribuem para a cor, força e sabor de boca do chá. São pigmentos formados a partir de catequinas e da degradação oxidativa das teaflovinas. (Obanda *et al.*, 2004)

Os lípidos e proteínas juntas perfazem 15% do peso seco do chá, sendo os lípidos essencialmente ácidos gordos e ésteres de ácidos gordos (Kumar *in* Preedy, 2013).

Quanto ao aroma, existem mais de 700 biomoléculas responsáveis pelo aroma do chá. Os compostos aromáticos (CVF – Compostos Voláteis de Flavor) dividem-se em dois grandes grupos, CVF I, constituído por derivados de lípidos e de ácidos gordos, que conferem odores verdes e herbais, e o CVF II, que confere aromas florais, e engloba compostos como os terpenóides e os carotenóides (Obanda e Owuor, 1995).

2.2.2.1 – Benefícios do chá

Como referido anteriormente, o chá é considerado uma bebida com propriedades benéficas para a saúde. Existem algumas evidências que corroboram esta afirmação, mas a maior parte provém de estudos epidemiológicos, *in vitro* ou estudos com animais, se bem que o número de ensaios em humanos tem vindo a aumentar nos últimos anos (Pinto, 2013). No entanto, são necessários estudos a longo prazo em seres humanos, que sejam correctamente controlados, para compreender os efeitos dos compostos bioactivos do chá no organismo humano.

Dito isto, existem indícios de acção benéfica do chá na redução de peso corporal e de acumulação de gordura no corpo (Rains, Agarwal e Maki, 2011); na redução do risco de diabetes tipo 2 (Odegaard *et al.*, 2008; Panagiotakos *et al.*, 2009); manutenção da memória e cognição (Jäger e Saaby, 2011); redução de incidência de doenças cardiovasculares (Basu e Lucas, 2007); reforço do sistema imunitário (Bukowski e Percival, 2008) e prevenção de osteoporose (Shen *et al.*, 2009).

2.2.3 – Morfologia da planta do chá

A planta do chá, é um arbusto perenifólio muito ramificado, existindo algumas cultivares com dimensões maiores, que podem até ser consideradas árvores. Existem 3 principais variedades de chá: *C. Sinensis* var. *sinensis* (chá de sabor mais delicado), *C. Sinensis* var. *assamica* (sabor forte e pouco refinado), *C. Sinensis* var. *cambodiensis* (é um híbrido das variedades anteriores, possuindo por isso características das duas) (Saberri, 2010). No entanto, de forma a facilitar a produção de chá, nomeadamente a colheita, as plantas são mantidas a alturas entre 1 e 1,5m. As suas folhas têm forma elíptica, de cor verde escura, brilhantes e aveludadas quando jovens. As flores são brancas, em número de 1 a 3 nas axilas das folhas, apresentando uma corola com 7 a 9 pétalas e cerca de 2 cm.

Os chás podem classificar-se de acordo com os métodos de fabrico e de colheita. O povo chinês foi o primeiro a classificar o chá, conforme a cor da infusão e o processo de fabrico: chá branco, chá verde (não fermentados), chá Oolong (semifermentado) e por fim, o chá preto (fermentado) (Rosa, 2004).

A colheita dos rebentos mais tenros, incluindo o botão terminal, e das folhas mais jovens, é feita nos arbustos com idades entre os 4 e os 12 anos. A colheita é realizada várias vezes por ano (3 a 6, no caso de países como a China e o Japão), embora alguns países cheguem a fazer 15 colheitas anuais. O chá obtido a partir das folhas da primeira colheita é o de melhor qualidade, havendo depois uma consequente quebra na qualidade. 20kg de folhas frescas originam cerca de 4 – 4,5kg de chá seco (Rosa, 2004).

2.2.3 – Produção de chá

2.2.3.1 – Método CTC para o chá preto

Existem dois métodos distintos de produção de chá preto: o método ortodoxo e o designado método CTC (Crush Tear Curl).

O método CTC ganhou popularidade a partir de 1950, por ser um processo simples e capaz de processar folhas de qualidade inferior, apresentando também potencial para produzir uma infusão mais forte (Ramasamy *et al.*, 2000).

O processo CTC para a produção de chá preto é o seguinte (Figura 2):

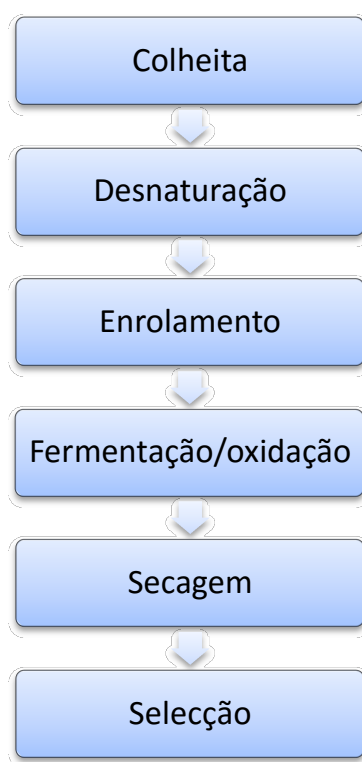


Figura 2 - Processo de produção de chá preto Crush Tear Curl (adaptado de Kumar *et al.* in Preedy, 2013)

Na produção do chá preto, é colhido o botão terminal e duas folhas (Wan *et al.*, 2009). Após a colheita, as folhas sofrem o desnaturaçãõ em local arejado. Esta ação pode ocorrer com a colocação de folhas estendidas em tabuleiros sobre redes de metal, através das quais passa uma corrente de ar quente (a temperatura controlada), num processo que pode durar até 24h (Rosa, 2004).

Neste processo ocorrem a desnaturaçãõ física, que acarreta reduçãõ da humidade da folha, o aumento da permeabilidade da membrana celular, o que prepara a folha para as operações seguintes; e a desnaturaçãõ química, com o aumento da presença de determinados compostos, como os aminoácidos, a cafeína e os ácidos orgânicos, bem como a ativaçãõ da enzima polifenol oxidase (Kumar *et al.*, 2013).

Durante a desnaturaçãõ verificam-se ainda alterações bioquímicas nas folhas, como a degradaçãõ de 15% das clorofilas em clorofilidos (Wickremasinghe e Perera, 1966), degradaçãõ dos carotenóides que origina compostos aromáticos desejáveis (Ravinchandran, 2002), aumento da quantidade de aminoácidos (possivelmente devido à degradaçãõ de proteínas) – alguns aminoácidos contribuem para o aroma do chá -, degradaçãõ de lípidos com formaçãõ de compostos aromáticos (Ravichandran e

Parthiban, 2000). Segundo Senthil Kumar (2004), o período de desnaturação que garante a qualidade máxima do chá é de 16 horas.

De seguida as folhas são enroladas, de modo a provocar a destruição das membranas das células, o que coloca os compostos constituintes das folhas em contacto com enzimas existentes. Esta etapa consiste na colocação das folhas sobre um tabuleiro assente numa superfície lisa, que é depois pressionada por uma espécie de tampa. A superfície e o tabuleiro giram em sentidos contrários. Existe depois um crivo através do qual passam as folhas, o que impede a formação de aglomerados de folhas ao mesmo tempo que separa as folhas mais finas das folhas de maior espessura, e estas últimas voltam a passar pela etapa do enrolamento. O enrolamento insuficiente é indesejável uma vez que tem como consequência uma infusão fraca. Assim, este processo pode ser repetido várias vezes na produção de chá. O objectivo é a quebra das células das folhas, com a consequente libertação de oxidases (incluindo a polifenol oxidase e a peroxidase) para haver oxidação das catequinas (Wan *et al.*, 2009).

Após o enrolamento, segue-se a fermentação, que na realidade se trata de uma reacção de oxidação, na qual os polifenóis presentes nas folhas são oxidados, com o auxílio da enzima polifenol oxidase.

A reacção de oxidação ocorre em câmaras específicas para este propósito, e nas quais as folhas são sujeitas a temperaturas que rondam os 35 - 40°C e em atmosfera húmida (95%) (Rosa, 2004). Nesta etapa, existe conversão das catequinas em teaflavinas e as tearrubinas, que conferem vigor, vivacidade e cor ao chá. A oxidação é controlada para assegurar uma correcta proporção entre as teaflavinas e as tearrubinas (ex: 1:10 a 1:12), de forma a satisfazer os critérios de qualidade estabelecidos. O período de fermentação varia entre 30 minutos a 3 horas (Wan *et al.*, 2009), dependendo da idade, variedade e tamanho das folhas. A fermentação termina quando a cor das folhas se alterou de verde para acobreado e há desenvolvimento de um aroma agradável.

A fermentação é influenciada pela temperatura, humidade e duração (Obanda *et al.*, 2001, Rajeev *et al.*, 2002).

Após a etapa de fermentação, o produto obtido é sujeito a uma secagem, com o intuito de se remover a humidade que ainda contém, até cerca de 3%. Observa-se alteração da cor, de vermelho acobreado para preto, fenómeno causado pela conversão da clorofila em feofitina. Apesar de, nesta fase, haver perda de compostos voláteis devido às elevadas temperaturas utilizadas, existe formação de novos compostos aromáticos, pois algumas reacções da etapa anterior ainda decorrem.

A derradeira etapa neste processo é a seleção, na qual as partículas de chá são separadas em diferentes categorias, de acordo com os requisitos comerciais do chá.

2.2.3.2 – Chá verde

A metodologia CTC para o processamento de chá verde apresenta semelhanças com a do processamento de chá preto. A principal discrepância é a ausência de um processo de fermentação/oxidação. As folhas de chá verde secam ao sol, ou artificialmente, durante 1 a 3 horas, ao longo das quais perdem quase 30% da sua humidade (Ahmed e Stepp, 2013). Nesta desnaturação promove-se a hidrólise de alguns hidratos de carbono insolúveis em água e a formação de catequinas (EC e ECG). As folhas podem ainda ser sujeitas a um processo de fixação. Este consiste na exposição das folhas a uma fonte de calor durante 10 – 15 minutos, para provocar a inativação das enzimas (polifenol oxidases), o que impede a fermentação e mantém a cor verde escura das folhas (Rosa, 2004).

A produção de chá verde encontra-se descrita na Figura 3.

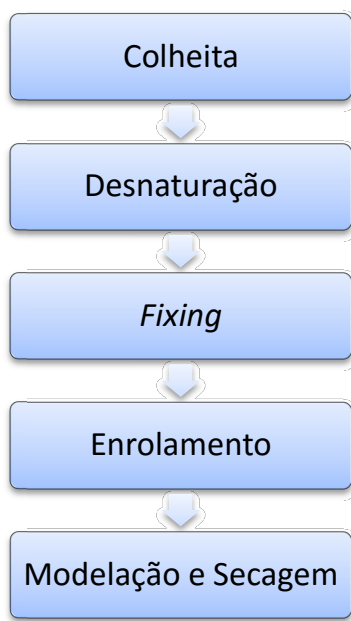


Figura 3 - Processo de produção de chá verde (adaptado de Ahmed e SteppinPreedy, 2013)

2.2.3.3 – Chá branco

O chá branco é colhido quando ainda se encontra em botão-termo branco vem da elevada proporção de botões prateados que é colhida - e é rapidamente sujeito a vapor (“steaming”) e seco, sem fermentação ou enrolamento (Figura xx).

Pode ser considerado a forma mais antiga de chá, porque é o menos processado. O menor processamento protege o sabor delicado, leve e ligeiramente doce, ao mesmo tempo que permite reter níveis elevados do fitoquímicos - quanto menor o processamento ou oxidação a que o chá é sujeito, maior a quantidade de antioxidantes polifenólicos que retém, o que inclui as catequinas. O seu elevado custo deve-se à selecção da matéria-prima e à sua colheita ser apenas num período de tempo limitado ao longo do ano (Mao, 2013).

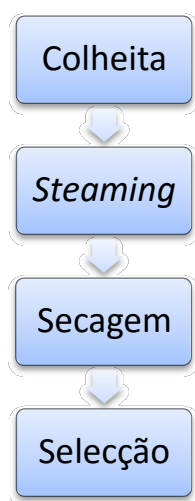


Figura 4 - Processo de produção de chá branco (adaptado de Mao in Preedy, 2013)

2.2.3.2 – Método ortodoxo

A produção ortodoxa de chá é um método tradicional que se distingue do CTC pela utilização, na etapa de enrolamento das folhas, cilindros ortodoxos. A matéria prima utilizada deve ser menos grosseira que no outro método. As fases de produção são semelhantes às do método CTC, mas o produto final é mais saboroso e de líquido mais leve que o chá processado pelo método CTC (Kumar, 2013).

2.3 –Kombucha

2.3.1 - Introdução

A kombucha é uma bebida consumida em todo o mundo obtida a partir da fermentação de infusão de folhas de chá por um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras.

Esta bebida é apresentada duas fracções: uma parte líquida levemente ácida e uma película celulósica que flutua à sua superfície (Jayabalan *et al.*, 2014).

A origem desta popular bebida remonta ao ano de 220 a. C, na região da Manchúria (China), onde era extremamente valorizada pelas suas supostas propriedades energizantes e desintoxicantes. Em 414 d. C. esta preparação foi levada para o Japão por um médico de nome Kombucom o objectivo de apaziguar os problemas digestivos do imperador Inkyo (Kallel *et al.*, 2012).

Com a expansão das rotas comerciais, a kombucha espalhou-se primeiro pela Rússia, e posteriormente por outros países da Europa de Leste, chegando aos países da Europa Ocidental na época da 2ª Guerra Mundial.

2.3.2 – Benefícios do consumo de kombucha

A kombucha está associada a diversos efeitos benéficos na saúde, nomeadamente a ação contra doenças metabólicas, artrite, psoríase, prisão de ventre, indigestão e hipertensão. No entanto, não existem ainda provas sólidas da sua eficácia. Apesar disto, a sua popularidade continua a assentar na sua fama como bebida promotora de saúde (Zhu *et al.*, 2000)

2.3.3 – Processo de produção de kombucha

Os substratos mais comuns para o fabrico de kombucha são chá preto e açúcar branco, apesar de se poder utilizar também chá verde.

O processo de fabrico é simples: adicionam-se folhas de chá a água fervente, e deixa-se repousar cerca de 10 minutos, ao fim dos quais se acrescenta sacarose (50g/L), dissolve-se e deixa-se arrefecer (Dufresne *et al.*, 1999). Posteriormente, transfere-se a infusão para um recipiente de boca larga, e adiciona-se kombucha (a película celulósica que flutua à superfície da bebida fermentada), numa proporção de 24g/L, e

0.2L de bebida kombucha previamente fermentada por cada litro de bebida que se quer preparar. O recipiente é coberto com gaze que se prende à boca do frasco por meio de um elástico ou fio . O preparado fica a incubar a temperatura ambiente (18 - 26°C). Após alguns dias, é possível ver uma nova cultura a flutuar à superfície do líquido - a cultura filha. Esta nova cultura é removida e colocada num outro recipiente com um pequeno volume de chá fermentado. A bebida remanescente é filtrada e armazenada em garrafas rolhadas a temperatura de refrigeração (Jayabalan *et al.*, 2014).

Há medida que decorre o processo fermentativo, as características organolépticas da bebida sofrem alterações, passando de um sabor agradável, amargo frutado no início da fermentação, para um sabor avinagrado após uma longa incubação.

2.3.4 - Caracterização microbiológica e química da kombucha

A kombucha é um consórcio de leveduras e bactérias que se desenvolvem em simbiose. A sua composição microbiológica exacta é algo complexo de determinar com rigor, pois varia com a origem dos inóculos.

Existem no entanto alguns microrganismos cuja existência nesta bebida é frequente. Em termos de bactérias, é comum a presença de *Acetobacterxylinum* (responsável pela produção da rede celulósica que flutua à superfície), *A. pasteurianus*, *A. aceti* e *Gluconobacteroxydans*.

Quanto às leveduras, foram encontradas leveduras pertencentes às espécies *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Pichia*, *Mycotorula* e *Mycoderma* (Jayabalan *et al.*, 2014).

.A análise química da bebida de kombuchamostra a presença de açúcares (sacarose, glucose e frutose), ácidos orgânicos (acético, glucónico, cítrico, málico, L-láctico, tartárico, oxálico, succínico, pirúvico), aminoácidos, etanol, minerais, vitaminas (C e do grupo B), polifenóis do chá, entre outros.

Os microrganismos presentes em kombucha utilizam os substratos de formas diferentes, mas complementares. As leveduras hidrolisam a sacarose em glucose e frutose, por ação de invertases, e produzem etanol por fermentação alcoólica (preferindo a frutose como substrato). Por seu lado, as bactérias acéticas utilizam a glucose para a produção de ácido glucónico, e o etanol para a síntese de ácido acético (Jayabalan *et al.*, 2014).

Devido à produção de ácidos orgânicos, o pH desta bebida diminui ao longo do processo fermentativo. Deste modo, é importante controlar a duração do processo de fermentação.

2.4 – O vinagre

2.4.1 - Introdução

O vinagre pode definir-se, de acordo com o Decreto-Lei número 174/2007 de 8 de Maio, como “o produto obtido exclusivamente pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de produtos de origem agrícola”, que podem ser diversos.

Contemplados neste mesmo decreto-lei estão os diferentes tipos de vinagre:

- a) «Vinagre de vinho», o vinagre obtido exclusivamente do vinho pelo processo biológico de fermentação acética;
- b) «Vinagre de fruta e vinagre de bagas», o vinagre obtido da fruta ou bagas de fruta pelo processo biológico de fermentação alcoólica e acética;
- c) «Vinagre de sidra», o vinagre obtido da sidra pelo processo biológico de fermentação acética;
- d) «Vinagre de álcool», o vinagre obtido do álcool destilado de origem agrícola pelo processo biológico de fermentação acética;
- e) «Vinagre de cereais», vinagre obtido, sem destilação intermédia, pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de cereais cujo amido tenha sido convertido em açúcares pela diastase de cevada maltada ou por qualquer outro processo;
- f) «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;
- g) «Vinagre de malte destilado», vinagre obtido pela destilação do vinagre de malte, sob pressão reduzida, contendo apenas os constituintes voláteis do vinagre de malte de que deriva;
- h) «Outros vinagres», vinagres de outros produtos de origem agrícola de dupla fermentação não contemplados nas alíneas anteriores, designadamente de mel, de cerveja, entre outros;

i) «Vinagres aromatizados e vinagres com especiarias», os vinagres referidos nas alíneas anteriores aos quais sejam adicionadas plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extractos aromatizantes, que sejam organolepticamente perceptíveis.

O vinagre é um produto com vastos séculos de história, existem registos de utilização de vinagre de tâmara na Mesopotâmia como condimento e agente de preservação de alimentos, por volta de 3000 a.C. (Sievers e Teuber, 1995). Pensa-se que a descoberta do vinagre esteja associada à descoberta do vinho – a palavra vinagre deriva de duas palavras latinas, *vinum* (vinho) e *acre* (acre), segundo Mecca *et al.*, 1979 in Laranjeira, 1998). É muito provável que o vinagre tenha origem em vinho que tenha sido deixado destapado e azedado espontaneamente.

2.4.2 – Utilização e benefícios do vinagre

O vinagre é usado por si só, como condimento e conservante, e como ingrediente na preparação de outros produtos, sejam eles molhos (ketchup e mostarda) e conservas (pickles) (Laranjeira, 1998).

Para além da utilidade gastronómica e conservante, o vinagre foi também utilizado ao longo dos tempos como tratamento de infecções e doenças. Atualmente, o vinagre é objecto de estudo no campo da medicina, nomeadamente os seus efeitos no metabolismo de diversos compostos (glúcidos e lípidos) (Petsiou *et al.*, 2014).

2.4.3 - Métodos de produção

O vinagre é produto de um processo natural, que ocorre quando vinhos e mostos são deixados em contacto com o ar. Ao longo do tempo, o vinagre ganhou estatuto e não é apenas um resultado da deterioração do vinho, é por si só um produto com valor (Tsfaye *et al.*, 2002).

2.4.3.1 – Métodos tradicionais

A metodologia tradicional de produção de vinagre consiste na produção estacionária não controlada. O vinho ou outro líquido alcoólico são colocados em barricas ou

recipientes semelhantes, mas de modo a que não fiquem totalmente cheias, pois verifica-se que o líquido substrato se transforma em vinagre muito mais rapidamente do que quando as mesmas não são completamente abastecidas (Fonte: Cruess, 1958, *cit in* Greenshields, 1977; Adams, 1985; Moretto *et al.*, 1988). A cultura de bactérias desenvolve-se em contacto com o oxigénio do ar.

Esta manufactura, em regime descontínuo, exige que em cada etapa de arranque do processo se restabeleça uma nova mãe de vinagre (cultura inicial), havendo deste modo desperdício de substrato, o que atrasa o processo produtivo. (Adams, 1985).

2.4.3.2 - Método Orléans e semelhantes

O método de Orléans também chamado de método francês é um método estacionário (Llaguno *et al.*, 1991) e semi-contínuo (Greenshields, 1997; Adams, 1985). Considerado o método industrial mais antigo, era originalmente feito em barricas de madeira de carvalho adaptadas ao fabrico de vinagre, com orifícios laterais protegidos por uma tela fina que impedia a entrada de drosófilas mas permitia a passagem do ar sobre a superfície líquida (Moretto *et al.*, 1988; Llaguno *et al.*, 1991).

O método de Orléans tornou-se realidade com a verificação de que as barricas, quando não eram completamente cheias, a transformação do vinho em vinagre era mais rápida.

O processo consiste em colocar vinagre produzido recentemente até um quarto a um terço da capacidade da barrica, adicionando-se depois o líquido a acetificar até perfazer cerca de metade a dois terços do volume total da barrica. O líquido utilizado é muitas vezes vinho de grau alcoólico pouco elevado misturado com 20% de vinagre.

Ao fim de algumas semanas ou até mesmo meses, uma porção do líquido obtido era retirada pela parte inferior da barrica, sendo acrescentada, através de uma espécie de funil na parte superior, uma nova parte de líquido alcoólico, de modo a não perturbar a película bacteriana entretanto formada, que se encontra à superfície.

A película bacteriana vai, ao longo do tempo, ficando mais espessa e, conseqüentemente, pesada. Para evitar que caia no fundo da barrica, é comum haver um suporte, de tela ou de madeira (Lima *et al.*, 1975; Greenshields, 1977).

No entanto, este método mais tradicional acarreta diversas desvantagens, como reduzido rendimento, a possível proliferação de bactérias produtoras de celulose ou

consumidoras de ácido acético (Lima *et al.*, 1975; Llaguno *et al.*, 1991), e o aparecimento de anguílulas, um nemátodo parasita.

O vinagre produzido por este método é considerado mais aromático e suave (Lima *et al.*, 1975; Moretto *et al.*, 1988).

2.4.3.3 – Método de fermentação submersa

O método utilizado atualmente para produção de vinagre é o da fermentação submersa num regime semi-contínuo. Neste regime, o substrato alcoólico é adicionado após o início do processo de acetificação e depois é continuamente adicionado, de acordo com o consumo de substrato verificado. O método semi-contínuo apresenta vantagens como a redução do risco de inibição de substrato, repressão de catabolito, permite a reutilização da cultura no ciclo subsequente (De Ory, I., Romero, L. E., *et al.*, 2007).

O modo semi-contínuo mais simples requer dois biorreactores colocados em série. No primeiro está o inóculo utilizado no ciclo anterior, onde é depois adicionado o líquido alcoólico que serve de substrato, que terá uma composição de 12 a 15% (v/v) de etanol e 1 – 2% (v/v) de ácido acético. Quando a matéria a acetificar atinge valores de 2 – 3% (v/v) de etanol, é transferida para o segundo biorreactor, onde permanece até a proporção de etanol atingir 0,2 – 0,3% (v/v) e a quantidade de ácido acético desejada é conseguida (Ebner, H., Sellmer, S., *et al.*, 1996).

A duração de um ciclo de fermentação é geralmente entre 18 a 30 horas, dependendo da concentração inicial de etanol, da duração da fase lag das bactérias e da eficácia do sistema de arejamento (Gullo *et al.*, 2014).

O vinagre produzido por este processo não possui os aromas que se encontram no vinagre produzido pelo método de Orléans (Novaes Fonseca, 1991), mas podem, se necessário, ser sujeitos a um processo de maturação. Durante o envelhecimento do vinagre, ocorrem reações de esterificação, com formação de compostos aromáticos (Lima *et al.*, 1975).

2.5 – Microrganismos envolvidos na produção de vinagre

2.5.1 - *Saccharomyces cerevisiae*

2.5.1.1 – Introdução

A utilização de microrganismos para o fabrico de pão e de diversas bebidas alcoólicas por parte dos seres humanos tem sido recorrente desde que existem registos históricos.

Um dos microrganismos mais comuns na produção de alimentos e bebidas fermentadas envolvendo fermentação alcoólica é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cujo nome *Saccharomyces* foi dado pelo investigador alemão Schwann, que chamou à levedura da cerveja, fungo do açúcar (*Saccharomyces*, em latim) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

O papel das leveduras na fermentação alcoólica foi definido em meados do século XIX, muito devido à contribuição de homens como Leeuwenhoek (observou leveduras num microscópio por si inventado, em 1680), Lavoisier (iniciou o estudo da fermentação alcoólica no século XVIII), Gay-Lussac (prosseguiu com o estudo da fermentação alcoólica no séc. XIX) e Louis Pasteur (conseguiu isolar algumas espécies de leveduras, estabeleceu o conceito de que as leveduras selvagens existentes na superfície das uvas eram as responsáveis pela fermentação natural de uvas esmagadas e do mosto) e demonstrou que é possível interromper o processo fermentativo alcoólico através da ação do calor e de alguns compostos químicos.

Para além do seu papel na produção alimentar, *S. cerevisiae* é também utilizada como organismo modelo em áreas como a Fisiologia e a Biologia Molecular, sendo o microrganismo eucariota mais estudado, tanto que o seu genoma foi o primeiro a ser sequenciado. Nos últimos anos, tem-se assistido também à sua aplicação na produção de bioetanol (Salvador, 2009).

2.5.1.2 - Classificação Taxonómica e características

No séc. XIX, a classificação taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae* foi proposta por Meyenex E.C. Hansen e encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*(adaptado de https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Saccharomyces_cerevisiae)

| | |
|----------|--------------------|
| Reino | Fungi |
| Subreino | Dikarya |
| Filo | Ascomycota |
| Subfilo | Saccharomycotina |
| Classe | Saccharomycetes |
| Ordem | Saccharomycetales |
| Família | Saccharomycetaceae |
| Género | Saccharomyces |
| Espécie | Cerevisiae |

Relativamente à morfologia, *Saccharomyces cerevisiae* forma colónias lisas e convexas, de coloração branca ou creme. Podem formar pseudohifas.

A sua reprodução é maioritariamente realizada por gemulação multilateral, processo no qual a nova gémula se forma numa porção lateral da célula-mãe.

As leveduras são os seres eucariotas mais simples que existem. As suas células apresentam dois envelopes celulares: a parede celular e a membrana. Esta característica auxilia a fermentação alcoólica. O espaço que existe entre estes dois componentes é designado espaço periplásmico.

A parede celular das leveduras é uma barreira rígida, constituída essencialmente por polissacáridos, conseguindo ainda manter alguma elasticidade. É um organelo dinâmico e multifuncional, uma vez que, para dar resposta a diversos factores externos, a sua composição e funções evoluem ao longo da vida da célula. A sua função primordial é a proteção da célula, uma vez que sem a sua existência, a célula rebentaria sob as diferenças de pressão osmótica interna/externa. É também a localização de diversas moléculas envolvidas na interação célula-célula como por exemplo a união sexual, e de diversas enzimas, geralmente hidrolases, que estão ligadas à parede celular ou situadas no espaço periplásmico.

A membrana plasmática é uma barreira de elevada seletividade, que monitoriza as trocas entre a célula e o ambiente exterior. A entrada de açúcares e aminoácidos na levedura dá-se por meio dos sistemas de transporte membranar, chamados permeases. Em relação ao transporte de açúcares, sabe-se que existem pelo menos dois tipos de sistemas de transporte de hexoses (maioritariamente glucose e frutose),

um de elevada afinidade e um de baixa afinidade. A sacarose (um dímero de glucose e frutose ligadas entre si por ligações α -1,4) é também utilizada pela *S. cerevisiae*, mas geralmente é hidrolisada por uma invertase no espaço periplásmico (Lagunas, 1992) muito embora existam algumas estirpes que apresentam um simporte activo de sacarose- H^+ (Stambuk *et al.*, 1999). A permease AGT1, que efetua o transporte ativo de maltose, também tem capacidade de transportar sacarose.

O citoplasma situado entre a membrana plasmática e a membrana nuclear, o citoplasma contém uma substância citoplásmica básica, o citosol. Este é uma solução tamponada com pH de aproximadamente 7, que contém glicogénio, ribossomas e enzimas solúveis. Encontram-se aqui as enzimas intervenientes na glicólise e na fermentação alcoólica.

Os organelos encontram-se isolados do citosol por membranas, sendo os principais o Retículo Endoplasmático Rugoso e Liso, o aparelho de Golgi, as mitocôndrias, os vacúolos e o núcleo.

2.5.1.3 - Vias metabólicas da *S. cerevisiae*

As leveduras obtêm a energia necessária para o seu crescimento e desenvolvimento a partir da degradação de nutrientes orgânicos.

De uma forma geral, a molécula energética por excelência nos sistemas biológicos é o ATP (adenosina trifosfato), cuja abundância em energia se deve à unidade trifosfato, que possui duas ligações fosfoanidro. A hidrólise do ATP em ADP liberta uma grande quantidade de energia livre (7,3 kcal/mol), que é utilizada para a biossíntese e o transporte ativo.

Nas células existem dois processos de produção de ATP: a fosforilação ao nível do substrato e fosforilação oxidativa.

A fosforilação ao nível do substrato (fermentação) em *S. cerevisiae* pode ocorrer quer na presença quer na ausência de oxigénio. Quando, durante a glicólise, ocorre uma oxidação por perda de electrões, existe formação de uma ligação entre o carbono oxidado do substrato e um molécula de fosfato inorgânico, que é uma ligação rica em energia. Seguidamente, desenrola-se uma transfosforilação, que transfere esta ligação para o ADP, formando ATP.

Por seu lado, a fosforilação oxidativa é um processo que em *S. cerevisiae* ocorre apenas na presença de O_2 , e na qual o transporte de electrões pela cadeia respiratória até ao aceitador final de electrões (o O_2) está ligado à produção de ATP via ATP sintase.

As leveduras apresentam capacidade para realizar ambos os processos, cujo início, nos dois casos, é um processo de glicólise (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

2.5.1.3.1 – Glicólise

A glicólise é uma sequência de reacções que ocorrem ao nível do citosol e que transformam a glucose em piruvato, com formação de ATP, como se pode observar pelo esquema na figura 5.

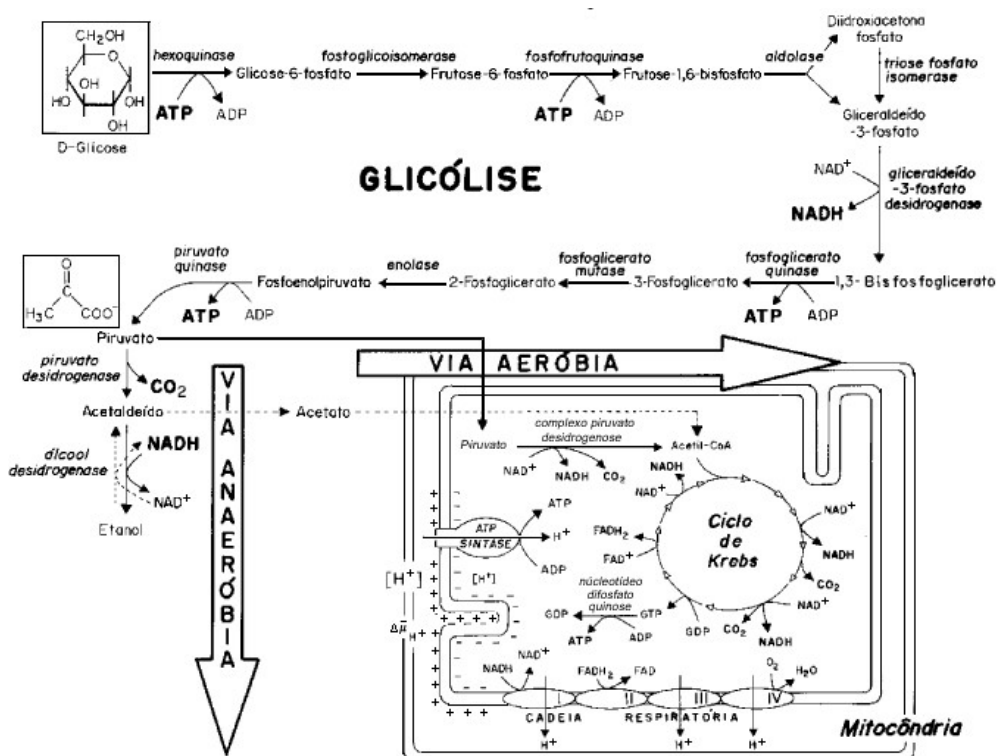


Figura 5 - Processo de glicólise Fonte: www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-4042200000200018

As hexoses são transportadas para o interior da célula através da membrana plasmática e numa primeira fase do processo ocorrem várias etapas da conversão da glucose em frutose 1,6-bifosfato, com gasto energético de duas moléculas de ATP. Por ação da aldolase, a frutose 1,6-bifosfato é dividida em dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato (GA3P). A dihidroxiacetona fosfato é convertida em GA3P, pois este último é constantemente eliminado pelas reacções seguintes da glicólise. Assim, uma molécula de glucose dá origem a duas moléculas de GA3P. O GA3P é

seguidamente convertido em 1,3-bifosfoglicerato, num processo de oxidação acoplada à formação de ATP via fosforilação ao nível do substrato.

Posteriormente, há uma transferência do grupo fosforil do 1,3-bifosfoglicerato para o ADP, com formação de ATP e de 3-fosfoglicerato.

Na derradeira fase da glicólise, o 3-fosfoglicerato é convertido em 2-fosfoglicerato, que de seguida é desidratado a fosfoenolpiruvato (pela enolase). Pela fosforilação do ADP, há conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato, com formação de ATP. Assim, a glicólise produz quatro moléculas de ATP, e tendo em conta que duas são utilizadas de imediato para a ativação de uma nova molécula de hexose, existe um rendimento líquido de duas moléculas de ATP por molécula de hexose metabolizada durante este processo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

2.5.1.3.2 - Fermentação alcoólica

O NADH produzido na glicólise necessita de transferir o seu poder redutor para um aceitador de electrões, para regenerar NAD⁺. No processo fermentativo alcoólico, o acetaldeído é o aceitador final de electrões.

A fermentação alcoólica consiste na conversão do piruvato em etanol, mediante duas reacções: a descarboxilação do piruvato (por acção da piruvatodescarboxilase), que forma acetaldeído (com libertação de CO₂); e a redução do acetaldeído a etanol, catalisada pela álcool desidrogenase (Zamora, 2009).

Relativamente ao ganho energético global da glicólise seguida de uma fermentação alcoólica, este é de duas moléculas de ATP por uma moléculas de glucose degradada, ou 14,6 kcal/mol de glucose fermentada (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

2.5.1.3.3 - Produção de outros metabolitos

Durante a fermentação alcoólica para além de etanol, a *S. cerevisiae* pode ainda produzir outros metabolitos como glicerol e ácido acético.

Em relação ao glicerol sabe-se que durante uma fermentação alcoólica típica, pelo menos cerca de 5% dos açúcares presentes no meio são desviados para a produção de glicerol (Scanes *et al.*, 1998) (Figura 6). Este desvio serve sobretudo para manter o equilíbrio redox através da re-oxidação do NADH produzido durante a formação de biomassa (vanDijken e Scheffers, 1986). Para além disso, em situações de stress

osmótico, provocado por exemplo por elevadas concentrações de açúcares, o glicerol é o principal soluto compatível produzido pela célula como forma de contrabalançar a pressão osmótica externa.

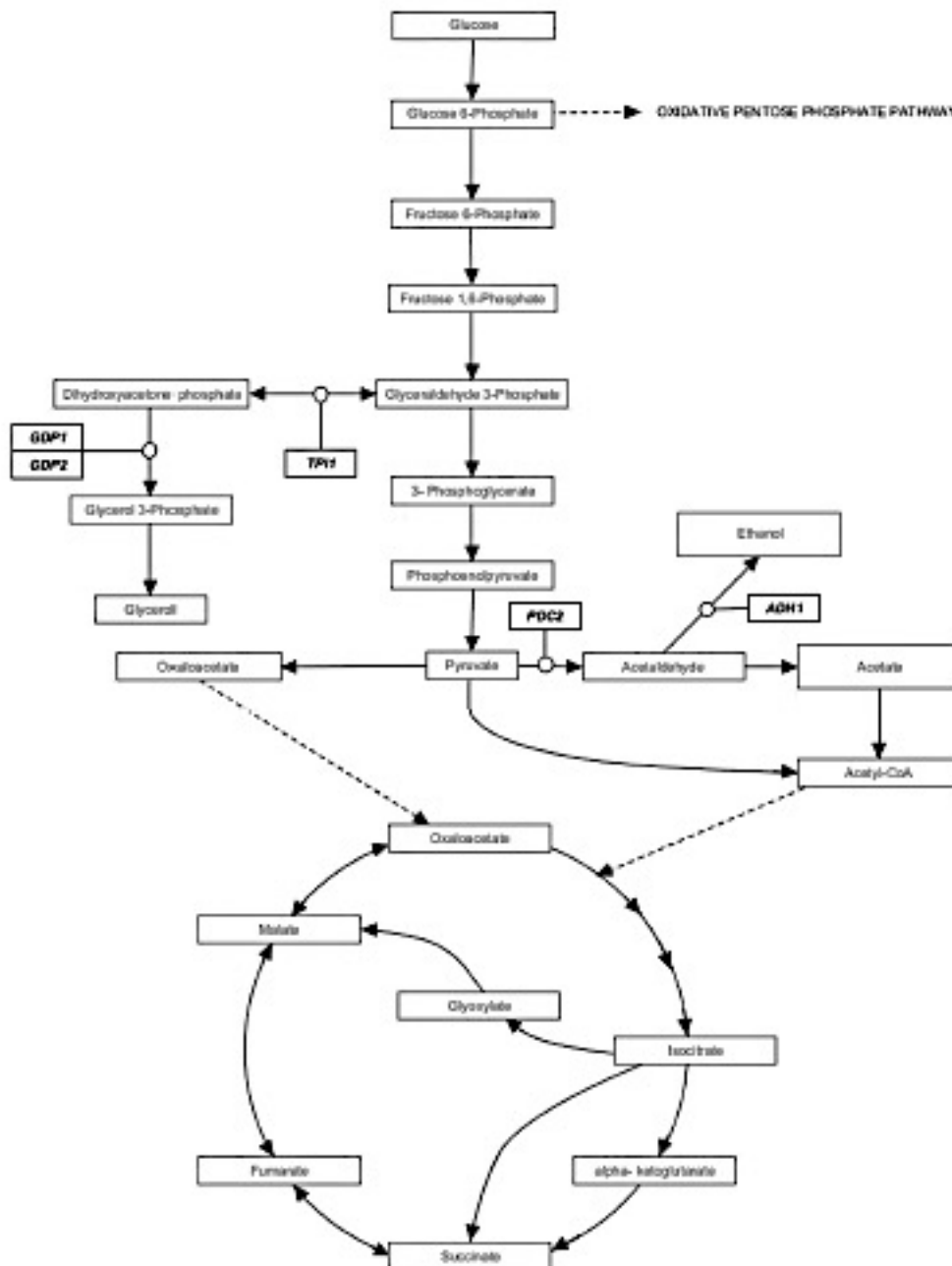


Figura 6 – Vias metabólicas envolvidas na produção de etanol por *S. cerevisiae* (Ciani *et al.*, 2016)

Em relação ao ácido acético, este resulta naturalmente do metabolismo do piruvato (Figura 6), sendo os seus níveis mais elevados no caso em que esta fermentação ocorre na ausência de agitação/arejamento (Estela-Escalante *et al.*, 2014). Na ausência de glucose ou de outra fonte de carbono repressora, o ácido acético pode

ser usado como fonte de carbono através do ciclo do glioxilato e da gluconeogênese (Gancedo e Gancedo, 1989). No entanto, em presença de glucose há repressão destas vias metabólicas levando à acumulação de ácido acético no meio de cultura o que, em conjunto com concentrações de etanol mais elevadas, poderá conduzir à paragem da fermentação e à consequente redução da produção de etanol (Graves *et al.*, 2006; Garay-Arroyo *et al.*, 2004).

2.5.2 - Bactérias acéticas

As bactérias acéticas (AAB), pertencentes à família Alpha-proteobacteria, são microrganismos aeróbios obrigatórios (Saichana *et al.*, 2014). É comum a sua existência na natureza, bem como em substâncias ricas em açúcar e álcool, uma vez que se encontram bem adaptadas a estes compostos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

As AAB possuem geralmente uma forma elipsoidal ou cilíndrica, com dimensões de 0,6 µm por 1-4 µm. Algumas têm cílios, rodeando a célula ou nas suas extremidades. Podem ser simples ou organizarem-se em pares e pequenas cadeias. A sua temperatura óptima de crescimento é de 25 a 30° C e os valores óptimos de pH situam-se entre 5 e 6, embora consigam crescer em meios com valores de pH inferior a 4 (Carrascosa *et al.*, 2011).

A estrutura celular das bactérias acéticas é semelhante a outras bactérias gram negativas, sendo constituídas por uma parede celular, uma membrana citoplasmática, o citoplasma, onde se encontram os ribossomas e um aparelho nuclear.

A parede constituinte das células bacterianas tem uma acção de protecção contra as variações osmóticas.

As AAB, sendo bactérias Gram negativas apresentam uma parede fina, constituída por várias camadas distintas com a organização fosfolípidos – lipoproteínas – lipopolissacáridos – peptidoglicanos, com uma camada fina de peptidoglicano, frouxamente organizada e uma membrana externa a esta camada, composta por lipoproteínas. A cada de peptidoglicano está separada da membrana plasmática por uma zona denominada periplasma.

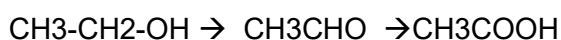
A membrana citoplasmática é composta maioritariamente por fosfolípidos dispostos em dupla camada, numa estrutura similar à presente nas células eucariotas. É responsável pelas trocas com o meio exterior, impedindo a passagem de moléculas de grandes dimensões e de moléculas hidrófilas de pequeno tamanho, permitindo a entrada à água, a gases, e moléculas hidrofóbicas de pequena dimensão (álcool,

ácidos gordos, por exemplo). Existem também um grande número de proteínas que se encontram inseridas na membrana, entre as quais enzimas que têm papel relevante em diversas atividades, como a respiração celular e a replicação do ADN. Algumas das proteínas existentes atravessam a membrana na sua totalidade, criando canais de difusão e de transporte ativo de metabolitos e de iões (Lacasse, 1995).

2.5.2.1 - Metabolismo

As bactérias acéticas (AAB) possuem capacidade para oxidar açúcares e álcoois, convertendo-os em ácidos orgânicos (Sengun *et al.*, 2010). O principal metabolito das AAB é o ácido acético.

A reacção de produção de ácido acético realiza-se de acordo com a seguinte equação:



Etanol etanal ácido acético

Este processo inicia-se com a oxidação do etanol em acetaldeído, por acção da PQQ-ADH (álcool desidrogenase pirroloquinolina dependente da quinona) em acetaldeído (ou etanal). Segue-se uma dismutação do acetaldeído em etanol e ácido acético. Em condições intensas de arejamento, a oxidação e a dismutação convertem todo o etanol em ácido acético. Se o meio estiver mais pobre em O₂, há acumulação de acetaldeído. Entre as AAB, as mais utilizadas são *Acetobacter* spp. e *Komogataeibacter* spp., por terem elevada resistência ao álcool e ao ácido acético. Possuem ainda a capacidade de produção de polissacáridos que lhes permitem flutuar à superfície do meio, auxiliando na captação de O₂ e conferindo protecção contra alguns factores (Saichana *et al.*, 2014).

2.5.3 – Métodos de identificação de microrganismos

2.5.3.1 – Introdução à técnica PCR

A técnica PCR consiste na amplificação de DNA por meio de polimerases de DNA, tendo aplicações em diversas áreas, como a medicina, a biotecnologia, e as ciências forenses. Esta técnica, foi desenvolvida em 1983 pelo Dr. Kary Mallis, um norte americano formado em Bioquímica, laureado com o Prémio Nobel da Química em

1993 por esta sua descoberta, considerada um dos maiores avanços tecnológicos na área da biologia molecular.

2.5.3.2 – Processo da técnica PCR

A técnica PCR é utilizada para amplificar uma pequena parte de uma cadeia de DNA. Pode ser apenas um gene ou até parte de um gene, usualmente até 10kb ou menos. Existem diversos componentes necessários à execução de PCR: 1) DNA molde: DNA genômico, cDNA ou DNA plasmídico que contém a região de DNA a ser amplificada; 2) duas sequências de iniciação (*primers*), que determinam o início e o fim da região da ser amplificada; 3) Taq DNA polimerase, que “copia” a região a ser amplificada; 4) nucleótidos; 5) uma solução tampão, que provisiona um ambiente adequado à ação da polimerase (Rahman *et al.*, 2013).

A reação de PCR decorre num termociclador, um aparelho que aquece e arrefece os *eppendorfs* de PCR que se encontram no seu interior, à temperatura precisa para cada etapa da reação. O termociclador possui uma tampa aquecida, de forma a evitar evaporação da mistura de reação, uma vez que os volumes utilizados são reduzidos (geralmente entre 15 a 100µL) Os tubos devem ter uma parede com reduzida espessura, que permita uma condução termal que leve ao equilíbrio térmico célere.

Os *primers* são normalmente cadeias artificiais curtas de DNA, com geralmente menos de 50 nucleótidos que são complementares ao início e ao fim do fragmento de DNA a ser amplificado. Os *primers* emparelham com o DNA molde, por complementação de sequências nos pontos de início e de término, aos quais a DNA polimerase se liga e inicia a síntese da nova cadeia de DNA.

O processo de PCR consiste em diversos ciclos, cada um com três passos. Em primeiro lugar ocorre a fase de desnaturação, com uma duração de 1 – 2 minutos, podendo ir até 5 minutos, na qual a mistura de reação é aquecida a temperaturas na ordem dos 94 - 96°C, de forma a separar a dupla cadeia de DNA da amostra. Antes do início do primeiro ciclo é comum o DNA sofrer um período longo de desnaturação, que assegura que tanto o DNA molde e os primers já não estão na forma de cadeia dupla. Nesta fase existe também a ativação da Taq polimerase.

Após a separação das cadeias de DNA, a temperatura diminui para os 45 - 60°C, de forma a que os primers possam ligar-se às cadeias individuais de DNA. Uma temperatura incorreta pode resultar em não haver ligação dos primers ao DNA. Esta etapa é denominada *annealing* e tem uma duração de 1 – 2 minutos.

Por fim, a DNA polimerase vai preencher as partes que faltam na cadeia, começando no *primer* que está ligado e percorrendo a restante cadeia de DNA, numa fase chamada extensão até encontrar uma zona de DNA em cadeia dupla. A temperatura nesta fase depende da DNA polimerase, e a duração é condicionada pelo tamanho do fragmento de DNA a ser amplificado. Geralmente, considera-se 1 minuto por 1kbp a amplificar.

2.5.3.3 – Electroforese

O produto de PCR pode ser identificado pelo seu tamanho mediante a utilização de electroforese com gel de agarose. A electroforese com gel de agarose consiste na introdução da amostra em gel de agarose ao qual é posteriormente sujeito a uma determinada corrente eléctrica. É também introduzida no gel uma pequena quantidade de DNA *ladder*, que contém fragmentos de DNA de tamanho conhecido. No decorrer da electroforese, as moléculas de DNA mais pequenas movem-se mais rapidamente ao longo do gel que as moléculas de maiores dimensões. O tamanho do produto de PCR é determinado quando comparado com o DNA *ladder* (Rahman *et al.*, 2013)..

2.6 – Análise Sensorial

2.6.1 – Princípios da Análise Sensorial

A análise sensorial tem sido utilizada pela humanidade desde que se avalia a conformidade de alimentos, água, abrigos, e tudo o que possa ser consumido e usado. A avaliação sensorial mais formal surgiu com o desenvolvimento e crescimento das trocas comerciais e das necessidades de avaliação da qualidade dos produtos, nas quais se dava a situação do comprador testar uma pequena parte de um carregamento de um qualquer produto, de forma a estabelecer a sua aceitação e o preço a pagar, com base na qualidade da mercadoria.

Com o tempo, foram desenvolvidos métodos de avaliar diversos produtos, entre os quais, vinho, chá, café, manteiga, peixe e carne. Esta avaliação deu eventualmente origem ao provador profissional e ao consultor, nas indústrias alimentares, de bebidas e de cosméticos (Meilgaard e Civille, 2007).

A análise sensorial é o método científico evocar, medir, analisar e interpretar respostas a produtos, percebidas através dos sentidos da visão, olfacto, tacto, palato e audição (Lawless e Heymann, 2010). De forma resumida, esta área científica estuda a relação entre um dado estímulo físico e a resposta do sujeito. Quando o estímulo atinge o órgão dos sentidos, é convertido num sinal nervoso que viaja até ao cérebro. No cérebro, as sensações são interpretadas, organizadas e integradas em percepções, que por sua vez são o alicerce da formulação da resposta.

Os princípios e práticas da avaliação sensorial envolvem cada uma das quatro atividades mencionadas nesta definição:

- evocar: fornecer orientação para a preparação e apresentação das amostras em condições controladas para que os factores de parcialidade/tendência sejam minimizados;
- medir: recolher informação numérica que permita estabelecer relações específicas e legítimas entre características do produto e percepção humana;
- analisar: analisar de modo rigoroso a informação é uma parte crucial da análise sensorial
- interpretar: interpretar a informação num contexto de hipóteses, conhecimentos de fundo e implicação de decisões e ações, pois a avaliação sensorial é uma experiência.

A função primária da avaliação sensorial é a condução de testes válidos e fidedignos que forneçam informação sobre a qual se possam tomar decisões sólidas.

Uma análise sensorial fidedigna baseia-se na capacidade do analista sensorial em otimizar 4 factores que governam o ato de se medir algo. São eles:

1. Definição do problema – o que é medido deve ser definido com precisão
2. Concepção do teste – o modelo do teste não deve deixar espaço à subjetividade e ter em conta as fontes conhecidas de parcialidade, bem como minimizar o período (número de testes necessários para a obtenção do rigor desejado nos testes
3. Instrumentação – os provadores devem ser seleccionados e treinados de modo a chegarem a um veredicto reproduzível
4. Interpretação de resultados – usando testes estatísticos para estabelecer apenas conclusões que são corroboradas pelos resultados dos testes sensoriais.

Os provadores, como instrumentos de medição, são variáveis com o tempo, variáveis entre si e bastante propensos à parcialidade. Para ter estes factores em conta, as

medições devem ser repetidas, devem existir suficientes indivíduos para que os veredictos sejam representativos e o analista sensorial deve respeitar os factores que ditam as atitudes do painel. Para além disso, é importante que o analista esteja ativamente envolvido no desenvolvimento de escalas utilizadas para medir a resposta do painel. Uma escala adequada requer estudo e deve basear-se no conhecimento rigoroso dos factores físico-químicos que governam a variável sensorial em questão, o que implica um treino eficaz do painel (Meilgaard e Civille, 2007).

A análise sensorial é determinante em diversas situações, que vão desde o desenvolvimento de novos produtos até ao controlo de qualidade. O Quadro 2 resume esta informação (Noronha, 2013).

Quadro 2 - Aplicações Práticas da Análise Sensorial

| | |
|---|---|
| Estudo de tempo de vida | Avaliação das características sensoriais de um produto ao longo do tempo |
| <i>Product Matching</i> | Comparação de um produto com um dado produto alvo |
| <i>Product Mapping</i> | Identificação da posição de um produto relativamente ao produtos seus concorrentes |
| Especificações e Controlo de Qualidade | Descrição das especificações de um produto, de forma a estabelecer um padrão de qualidade para esse produto |
| Reformulação de produto | Reformulação de um produto por diversas razões |

2.6.2 – Condução de um teste sensorial

Os testes sensoriais devem ser realizados num local específico para o efeito. Este local deve obedecer a uma série de requisitos, como ser constituído por materiais não poroso de fácil limpeza e de cores neutras, que não interfiram com os testes a efetuar. A iluminação deve ser uniforme, e o mais aproximada possível da luz natural. É comum que existam cabinas de teste individuais, pois assim não existe comunicação entre provadores e as distrações são evitadas. Recomenda-se a existência de

pelomenos 3 cabinas, sendo usual haver 5 a 10 cabinas, com uma temperatura e humidade agradáveis e constantes; sem ruídos externos; ventilação adequada e com isenção de odores.

O responsável pelo teste sensorial – o analista sensorial – tem a seu cargo diversas ações cruciais para o sucesso da análise sensorial.

Erhardt (1978) dividiu o papel do analista sensorial em sete tarefas:

1. Determinar o objectivo do projeto - definir as necessidades do líder do projeto (melhoria de produto, redução de custos, substituição de ingredientes, comparação com produto concorrente)
2. Determinar o objectivo do teste – diferença geral, diferença de atributos, preferência relativa, aceitabilidade
3. Examinar as amostras – o analista sensorial deve examinar todas as propriedades sensoriais das amostras a serem testadas, de modo a poder escolher-se o método de teste adequado
4. Conceber (projetar) o teste – seleção da técnica de teste, seleção e treino do painel, concepção da folha que acompanha o teste, método de análise de resultados
5. Conduzir o teste
6. Analisar os dados – ter em conta o objectivo do teste e outras variáveis
7. Interpretar e reportar resultados – para que se possa fazer recomendações da ação ou ações a tomar

É relevante neste ponto referir também que a apresentação das amostras tem um papel importante para a obtenção de resultados fidedignos nestes testes. As amostras devem ser servidas à sua temperatura ideal de consumo, e numa quantidade que permita a sua avaliação (15 a 20mL para produtos líquidos, 25 a 30g no caso dos produtos sólidos) (Noronha, 2013).

2.6.2.1 – Testes sensoriais

Possivelmente, a tarefa mais importante para o analista sensorial é a escolha do teste a utilizar. Como já foi referido, a metodologia de teste a utilizar está dependente do objectivo do estudo sensorial. Existem três tipos de testes sensoriais, os testes discriminatórios, os testes descritivos e os testes hedónicos.

2.6.2.1.1 – Testes discriminatórios

Os testes discriminatórios, que são testes analíticos, que se utilizam quando se pretende determinar se existe uma diferença perceptível entre dois tipos de produtos. Neste tipo de teste, podem ser utilizadas diversas formas de apresentação das amostras a avaliar, como por exemplo a prova triangular (são apresentadas três amostras, sendo duas delas iguais; os provadores devem identificar a amostra diferente), dois em cinco (apresentadas 5 amostras, duas de um tipo e três de outro; os provadores devem agrupá-las conforme o seu tipo), prova duo-trio (é apresentada uma amostra referência e de seguida duas amostras, entre as quais os provadores devem identificar qual é igual à amostra referência), prova de diferenças simples (são apresentadas duas amostras e os provadores devem identificar qual a amostra diferente), prova A – não A (após formação dos provadores para identificação de amostras do tipo A, são lhes apresentadas diversas amostras e pedido que identifiquem as amostras tipo A), prova diferença do controlo (são apresentadas uma amostra de referência e um ou mais outras amostras e os provadores devem avaliar quão diferente são as amostras, em relação à amostra de referência) (Meilgaard 2007). A análise é depois feita com base na contagem de respostas corretas e incorretas. A partir destes dados podem inferir-se diferenças baseadas na proporção de pessoas que são capazes de fazer a escolha correta (Lawless e Heymann, 2010).

2.6.2.1.2 – Testes descritivos

Os testes descritivos, que também são analíticos, quantificam a intensidade percebida das características sensoriais de um produto. Começando no final dos anos 40, foram desenvolvidos métodos de análise e perfilagem das diferentes características sensoriais, recorrendo a um painel de provadores treinados. Providência um meio para caracterizar os atributos individuais e uma descrição analítica de diferenças entre um grupo de produtos em desenvolvimento. Este tipo de testes, é uma ferramenta de grande utilidade, pois é aplicável à caracterização de uma grande variedade de alterações em produtos e questões de investigação como o desenvolvimento de produtos alimentares (Lawless e Heymann, 2010).

2.6.2.1.3 – Testes hedónicos

Os testes hedónicos têm como objectivo a quantificação do grau de gostar ou não gostar de um produto. A abordagem mais simples é dizer a pessoas que escolham entre produtos alternativos e ver se existe uma preferência clara por parte da maioria dos provadores.

Este teste implica a utilização de uma escala. Tipicamente um teste hedónico envolve uma amostra de 75 – 150 consumidores habituais do produto. A necessidade de um painel com mais provadores advém da elevada variabilidade das preferências individuais, que é compensada com maior número de pessoas para assegurar significância estatística e sensibilidade do teste.

O inconveniente dos testes hedónicos é que não são muito informativos sobre a magnitude do ato de gostar ou não gostar.

O princípio central da avaliação sensorial é que o método de teste deve corresponder aos objectivos do teste. De modo a atingir este princípio, deve haver comunicação clara entre o responsável pelo teste sensorial e o cliente ou utilizador final da informação recolhida.

Por vezes podem haver múltiplos objectivos, sendo necessária uma sequência de testes.

Torna-se crucial a compreensão e especificação do tipo de informação necessária por parte dos utilizadores finais, bem como o conhecimento da utilidade e limitações de cada teste (Lawless e Heymann, 2010).

3. Material e métodos

3.1 - Microrganismos e meios de cultura

Ao longo da realização deste trabalho, foram utilizados diversos microorganismos.

Durante a primeira fase do trabalho experimental, foram utilizadas duas estirpes de leveduras para realizar a fermentação alcoólica dos chás, uma estirpe vínica de *S. cerevisiae* (ISA1000) e uma estirpe de levedura imobilizada ProElif (Proenol).

No caso da estirpe *S. cerevisiae* ISA1000, esta foi regularmente repicada em meio sólido YPD(1% extracto de levedura, 2% bactopectona, 2% glucose, 1,5% bactoagar), incubada a 28°C até se observar crescimento significativo e conservada a 4°C após crescimento. A levedura imobilizada foi mantida igualmente a 4°C.

Numa fase mais posterior, foram também empregues os inóculos de kombucha (mãe de kombucha) e de vinagre (mãe de vinagre), que foram mantidas à temperatura ambiente, em chá fermentado e vinagre, respectivamente.

3.2 – Preparação de vinagre

3.2.1 - Preparação dos chás

Numa primeira fase preparou-se chá por infusão com aproximadamente 10g de chá preto (Lipton Yellow Label) por litro de água desmineralizada a 100°C. A carteira foi retirada após um período de repouso de 10 minutos. Adicionou-se sacarose em concentrações de 8, 10 e 12% e em seguida parte do chá foi esterilizado (120°/1h20).

Numa segunda fase foram preparados para além de chá preto, chá branco e chá verde com as mesmas concentrações de sacarose.

3.2.2 - Preparação de kombucha

Aproveitando o trabalho que uma colega (Mafalda Santos) estava a realizar no âmbito de chás fermentados com kombucha, foi também empregue kombucha para a produção de vinagre. Foi utilizada a película celulósica que flutua na superfície da bebida kombucha.

3.2.3. – Preparação do inóculo

Com vista à preparação de um inóculo em condições padrão, no caso da estirpe *S. cerevisiae* ISA1000 inoculou-se uma cultura fresca proveniente de uma placa de meio YPD em 300mL de YPD (1% extracto de levedura, 2% bactopectona, 2% glucose), e incubou-se durante 24h com agitação orbital. O número de células foi calculado com base na Densidade Óptica da cultura a 640nm no espectrofotómetro (Ultrospec 2100 *pro*). Imediatamente antes de inocular, o centrifugou-se a suspensão (Centrifuge 5810 R) a 4°C durante 5 minutos, e ressuspendeu-se em água desmineralizada estéril de modo a obter uma DO de aproximadamente 100, reduzindo desta forma o volume a inocular no chá.

Inoculou-se o chá de forma a obter uma DO inicial de 0.1.

No caso da levedura imobilizada, inoculou-se diretamente 250mL de chá açucarado com 5g de levedura imobilizada.

3.2.3 - Fermentação do chá

Prepararam-se 6L de chá preto que foram depois distribuídos por diversos frascos Schott de 250mL aos quais foi adicionada uma determinada quantidade de sacarose, de acordo com as seguintes Tabelas (Tabela 2 e Tabela 3):

Tabela 2 - Distribuição de chá por frascos (Bebida pasteurizada)

| Concentração de sacarose | Distribuição por frascos - Pasteurizada |
|---------------------------------|--|
| 8% | 250mL inoculados com levedura imobilizada |
| | 250mL inoculados com ISA1000 |
| 10% | 250mL inoculados com levedura imobilizada |
| | 250mL inoculados com ISA1000 |
| 12% | 250mL inoculados com levedura imobilizada |
| | 250mL inoculados com ISA1000 |

Tabela 3 - Distribuição de chá por frascos (Bebida esterilizada)

| Concentração de sacarose | Distribuição por frascos - Esterilizada |
|---------------------------------|--|
| 8% | 250mL inoculados com levedura imobilizada |
| | 250mL inoculados com ISA1000 |
| 10% | 250mL inoculados com levedura imobilizada |
| | 250mL inoculados com ISA1000 |
| 12% | 250mL inoculados com levedura imobilizada |
| | 250mL inoculados com ISA1000 |

A fim de se poder selecionar as condições mais favoráveis para o processo fermentativo, foram utilizados chás apenas pasteurizados e chás esterilizados por autoclavagem (Autoclave P SelectaMediclave S-477 MED).

Após a inoculação com as diferentes estirpes de levedura, os frascos Schott foram colocados em banho de água com agitação (Kottermann), a temperatura de 25°C (Figura 7) até esgotamento dos açúcares.



Figura 7 - Equipamento de imersão com agitação

3.2.4 - Preparação do vinagre

O vinagre foi preparado utilizando frascos previamente esterilizados no autoclavee devidamente identificados, onde foram colocados os diferentes chás fermentados, perfazendo aproximadamente 200mL de líquido.

Para os frascos a ser fermentados por culturas de vinagre, acrescentou-se aproximadamente 10g de mãe de vinagre e 15mL de suspensão (líquido onde se encontra a mãe de vinagre).

Em relação aos frascos a serem fermentados por kombucha, foram acrescentadas 10g de mãe de kombucha e 15ml de suspensão.

Todos os frascos foram tapados com gaze e mantidos a temperatura ambiente num local abrigado no interior do laboratório durante 30 dias

3.2.5 - Recolha de amostras

Ao longo do processo fermentativo do chá e da produção de vinagre, foram retiradas amostras de forma regular, para possibilitar a quantificação de diferentes compostos presentes no líquido. Recolheu-se 1mL de suspensão para microtubos de 1,5mL. Os microtubos contendo as amostras foram armazenados a -18°C para posterior análise. Todas as amostras foram retiradas em duplicado.

3.3 - Métodos analíticos – HPLC

3.3.1.- Preparação do eluente

O eluente necessário para a corrida das amostras por HPLC foi uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5mM preparado em água miliQ.

O eluente foi preparado em frascos Schott de 1L através da diluição de solução *stock* de ácido sulfúrico 25mM, e posteriormente desgaseificado de modo a remover o ar existente no líquido conectando o frasco a uma bomba de vácuo (PALL LifeSciences) e colocando-o no aparelho de ultrassons (P Selecta Ultrasons) até não se observar formação visível de bolhas ou no mínimo 15 minutos. Foi realizada nova desgaseificação sempre que as soluções ficaram armazenadas e/ou ocorresse agitação.

3.3.2 - Preparação das amostras

Todas as amostras analisadas por HPLC foram submetidas a uma preparação específica para este equipamento.

As amostras congeladas foram descongeladas à temperatura ambiente e de seguida centrifugadas (Sigma 1-14 Microfuge) a 12000 rpm durante 10 minutos, aproveitando-se o sobrenadante, que foi transferido para um novo eppendorf. Acrescentaram-se 30µL de ácido perclórico a 70% a cada um dos eppendorfs com sobrenadante e colocou-se em gelo durante 30 minutos. Após este período de tempo, as amostras foram sujeitas novamente a centrifugação, a 12000 rpm durante 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante, e filtrou-se para os vials (Waters) (Figura 8) utilizados no equipamento de amostragem automática do sistema de HPLC, utilizando uma seringa acoplada a um filtro milipore 0.2µm (Advantec Membrane Filter, Toyo Roshi Kaisha) (Figura 9).



Figura 8 - Vial (Waters)



Figura 9 - Seringa hipodérmica e filtro

Os vials com as amostras preparadas foram guardados a 4°C até à sua análise por HPLC.

3.3.3 - Curvas de calibração

De forma a determinar a concentração dos componentes das amostras (glucose, frutose, etanol e ácido acético) com base nas áreas dos picos correspondentes, realizaram-se curvas de calibração para cada um dos compostos estipulados, com soluções de diferente concentração (Tabela 4).

Os resultados obtidos da análise destas amostras pela metodologia HPLC foram analisados no software Empower e transpostos para o Microsoft Office Excel, onde se obteve uma recta de regressão linear.

Tabela 4 - Concentrações utilizadas para a obtenção de curvas de calibração

| Glucose (g/L) | Frutose (g/L) | Etanol (g/L) | Ácido acético(g/L) |
|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|
| 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 |
| 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 2 | 2 | 2 |
| 5 | 5 | 5 | 5 |
| 10 | 10 | 10 | 10 |

3.3.4 – HPLC

As amostras recolhidas ao longo da fermentação alcoólica e no vinagre ao longo da sua produção bem como as soluções padrão foram analisadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

O sistema de HPLC é constituído por um sistema de bomba de injeção (Waters, 515 HPLC Pump), uma coluna de exclusão iónica para análise de açúcares e ácidos orgânicos (Shodex, SUGAR SH1011), um aparelho de amostragem automática (Waters, 717 Plus Autosampler), um detector de absorvância (Absorvância a 210nm) (Waters 486 Tunable Absorbance Detector), um detector de índice de refração (Waters 2410 RefractiveIndex Detector) e um controlador de temperatura (CROCO-CIL, TemperatureControl).

As amostras foram analisadas em triplicado, retirando-se 10µL de cada vez, e cada injeção tinha a duração de 30 minutos, de forma a permitir a detecção de todos os compostos previamente determinados. As condições de análise, constantes ao longo do tempo, foram uma temperatura de 60° para a coluna, em simultâneo com um fluxo de 0,5mL/min de eluente.

3.3.5 – Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado com auxílio de um eléctrodo de pH (PHM92 LAB pH METER, RADIOMETER COPENHAGEN).

3.4 - Métodos moleculares

3.4.1 – Isolamento de microrganismos presentes no vinagre

No final da produção do vinagre, foram recolhidas amostras para identificação de bactérias acéticas presentes no produto. Inocularam-se 100µL de amostra das suspensões não diluídas provenientes do vinagre de chá preto e do vinagre de chá branco em placas com meio GYC (30g/L de carbonato de cálcio, 50g/L de glucose, 10g/L de extracto de levedura, 12.5% agar, pH 4.5), por espalhamento com vareta de vidro dobrada em L. As placas inoculadas foram mantidas em estufa (Memmert) a 28°C, durante 5 a 7 dias.

Quando se verificou crescimento de colónias com características desejadas, efectuou-se o seu isolamento, repicando uma colónia isolada para novas placas com meio GYC, e incubou-se em estufa a 28°C durante 5 dias.

3.4.2 – PCR

3.4.2.1 – Extracção de DNA

O DNA proveniente das culturas isoladas em placas de GYC foi extraído utilizando o kit de extracção Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit procedendo-se de acordo com a instruções do fabricante.

3.4.2.2 – PCR

Em primeiro lugar, foi preparada uma solução mix de PCR com 10µL tampão Taq 5x, 35,8µL água milli-Q esterilizada, 1µL primer AC1, 1µL primer AC3, 1µL dNTP MIX (10mM), 0,2µL TaqPhusion (2U/µL) para cada uma das amostras, incluindo um controlo negativo (*Escherichia coli*) e um controlo positivo (*Gluconacetobacter hansenii*). Em tubos de PCR devidamente identificados, pipetou-se 49µL da solução mix de PCR e 1µL de DNA de cada uma das amostras obtido pelo protocolo de extração de DNA (ver 3.4.2.3). No caso do controlo negativo, adicionou-se 1µL de água milli-Q esterilizada. Depois de um ligeiro vortex, os tubos foram colocados no termociclador (epENDOR fMastercyclerpersonal), a correr o seguinte programa: 7 minutos a 95°C, seguido de um período de um minuto a 95°C, 2 minutos a 64°C e 2

minutos a 72°C, período esse que foi repetido 40 vezes. Para terminar, um período de 10 minutos a 72°C. Os tubos foram depois mantidos a 4°C.

Ac1: 5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3'

Ac3: 5'-AACAC ATGCTCCACCGCTTG-3' .

3.4.2.3 – Observação e quantificação do DNA por electroforese em gel de agarose

Os produtos obtidos em 3.4.2.2 foram analisados por electroforese em gel de 2% (p/v) de agarose preparado com tampão TEA 1x

As amostras anteriormente preparadas foram cada uma carregadas num poço respectivo, tendo-se utilizado com marcador 5µL de DNA ladder (Ladder I, EnzyTech). Foi efectuada uma corrida de 45 minutos a corrente constante de 80V. Após este processo, o gel foi observado num equipamento de raios ultravioleta (CleverClearView UV Transilluminator).

3.4.2.4 – Sequenciação

Antes de serem sequenciados, as amostras foram purificadas pelo ZymoClean™ Gel Recovery Kit, seguindo as instruções do fabricante.

Após o passo da purificação, as amostras foram enviadas para sequenciação pela STABVida (Portugal) utilizando os primers AC1 e AC3. As sequências foram analisadas através da plataforma BLAST.

3.5 – Análise Sensorial

Uma vez escolhidas as formulações que apresentavam características mais interessantes, foi realizada a avaliação sensorial.

Numa primeira instância, as formulações foram analisadas por um grupo restrito de provadores experientes, que selecionaram 6 amostras que consideraram mais

apelativas. Adicionou-se uma amostra de vinagre de vinho branco (acidez 6,5%), para efeito de comparação e, de seguida, as amostras foram sujeitas a avaliação por parte de um grupo de potenciais consumidores.

Foi estabelecido um número mínimo de 20 provadores.

As amostras foram servidas misturadas com azeite refinado, numa proporção de 1 parte de vinagre para três partes de azeite refinado, de forma a simular a utilização do vinagre como tempero, e apresentadas aos consumidores em pratos brancos identificados pelo código da amostra. Foram acompanhadas de pedaços de pão, de forma a molhá-lo na mistura e assim provar. Entre cada amostra, foi servido aos provadores um copo com água.

As provas sensoriais foram conduzidas numa sala apropriada para o efeito.

4 - Resultados e discussão

O presente trabalho teve como objectivo produzir um vinagre a partir de uma base inovadora - chá preto, chá verde e chá branco – usando dois inóculos, um com base no processo tradicional por inoculação com uma “mãe de vinagre” e um segundo utilizando um inóculo proveniente de chá fermentado (Kombucha) ou seja uma “mãe da kombucha”.

4.1 – Ensaio de fermentação alcoólica

4.1.1. Comparação entre levedura imobilizada e não imobilizada

Numa primeira fase do trabalho foram feitos testes apenas em chá preto, com o objetivo de comparar a eficiência de fermentação de duas estirpes de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, responsável pela fermentação alcoólica do chá açucarado, a estirpe ISA1000 e a levedura imobilizada ProElif (Proenol), ao longo do período de fermentação (14 dias).

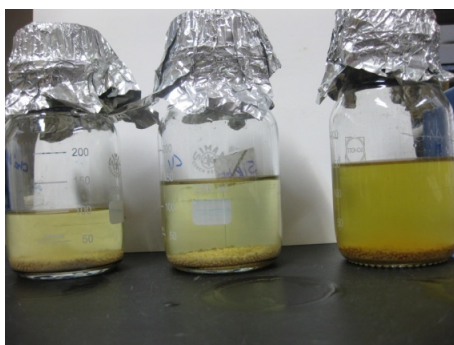


Figura 10 - Chá açucarado inoculado com levedura imobilizada ProElif

Retiraram-se amostras regularmente, que foram mantidas a -18°C até à sua posterior análise por HPLC de forma a determinar e quantificar os compostos nelas existentes.

Em primeiro lugar, foram obtidas as curvas de calibração para os compostos mais pertinentes no âmbito deste trabalho, os açúcares glucose, frutose, o etanol (na fase da fermentação alcoólica) e o ácido acético, no caso do vinagre propriamente dito. As rectas de calibração utilizadas (Anexo 2) foram concebidas fazendo uma proporção entre a área do pico correspondente a um padrão, uma vez que era presença

constante em todos os cromatogramas, com área e tempos de retenção constantes, e a área do pico correspondente a cada um dos compostos presentes.

Para cada uma das diferentes concentrações de sacarose utilizadas (adicionadas ao chá) e para a levedura imobilizada e em suspensão (não imobilizada), foi possível observar-se a variação na concentração de açúcares e etanol (Figuras 11 e 13).

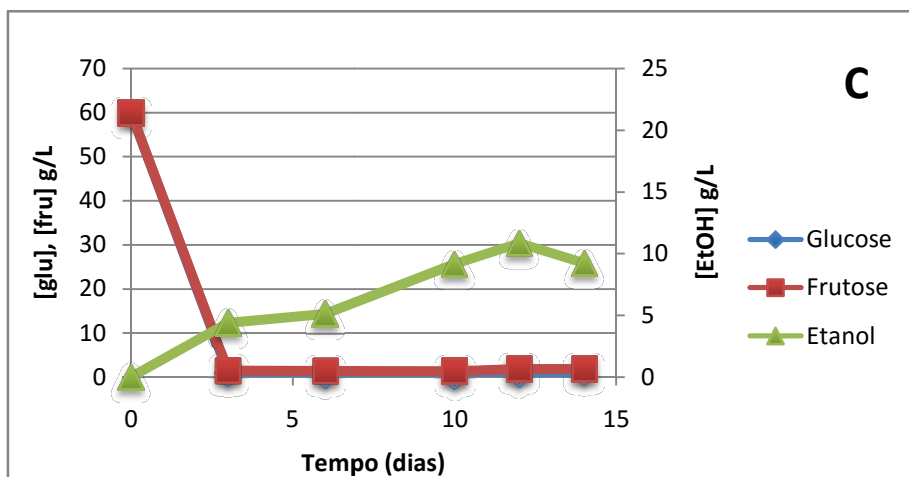
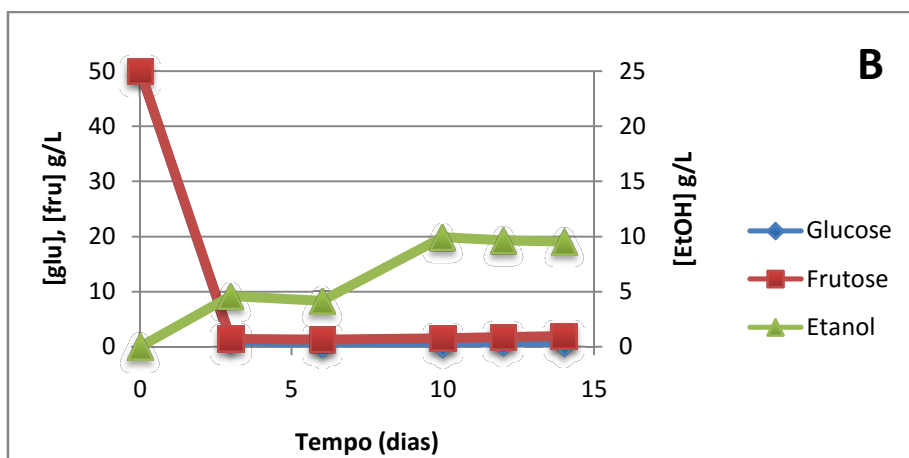
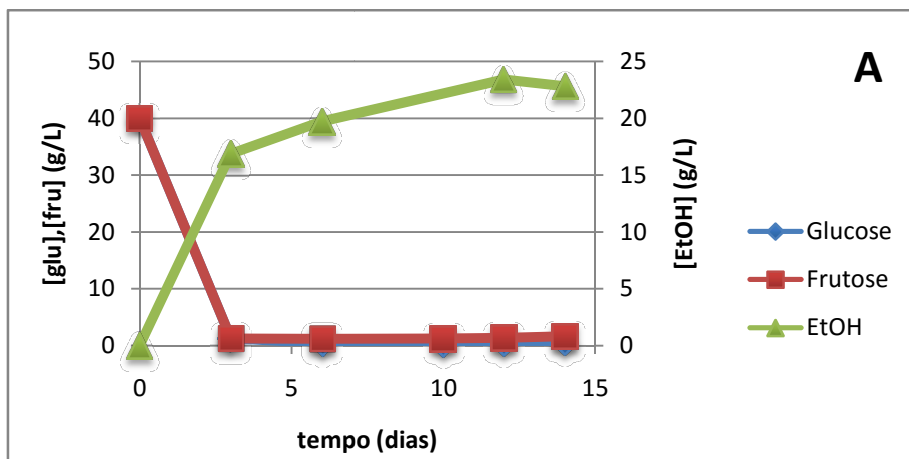


Figura 11 - Concentração de compostos ao longo de fermentação de chá inoculado com levedura imobilizada. (A) 8%, (B) 10% e (C) 12% sacarose inicial.

No caso em que se utilizou levedura imobilizada é possível observar que nos primeiros dias do processo fermentativo, e para qualquer das concentrações de sacarose inicial usadas, é bastante evidente uma diminuição significativa e abrupta da concentração de glicose e frutose nas amostras (Figura 11A, 11B e 11C), algo que seria expectável tendo em conta que o crescimento e metabolismo das leveduras é mais acelerado neste período. Em simultâneo com o consumo de glicose e frutose ocorre a produção

de etanol, resultante do metabolismo destes dois compostos por parte da levedura. No caso da fermentação a 8% de sacarose, produção de etanol acompanha o esgotamento dos açúcares, ocorrendo de forma bastante rápida nos primeiros três dias, e abrandando no final da fermentação quando a concentração de açúcares já é muito baixa. No entanto, quando se observam os resultados para 10% e 12% de sacarose inicial (Figura 11B e 11C), a produção de etanol muito embora acompanhe o decréscimo inicial dos açúcares não acompanha rigorosamente o consumo de glucose e frutose como na formulação com menor concentração de açúcares inicial (Figura 11A), atingindo-se valores finais de etanol cerca de 50% menores que na fermentação com 8% de sacarose. Este facto poder-se-á dever a um desvio do metabolismo no sentido da produção de glicerol em resultado do stress osmótico. Este composto deverá corresponder ao pico próximo dos 15.3 min visível nos cromatogramas (Figura 12A, 12B e 12C) cuja concentração relativa (face ao padrão) é superior nestas duas concentrações.

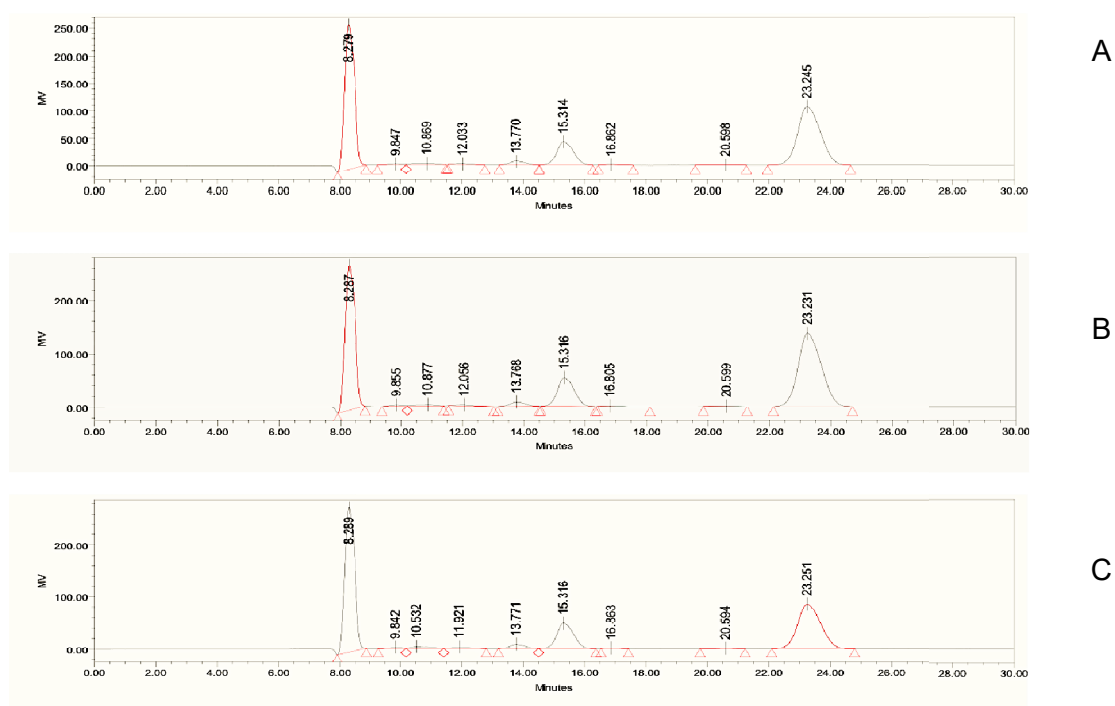


Figura 12 – Cromatograma obtido para as amostras ao dia 14 de fermentação alcoólica com levedura imobilizada. (A)8%, (B) 10% e (C) 12% sacarose inicial.

Para além da produção de etanol e glicerol, verifica-se ainda alguma produção de pequenas quantidades de ácido acético para as três concentrações iniciais de sacarose, cujo aumento é progressivo ao longo da fermentação (Figura 13A, 13B e 13C) e que é igualmente visível pelo aparecimento do pico correspondente a cerca de

16,8 minutos nos cromatogramas apresentados anteriormente (Figura 12A, 12B e 12C).

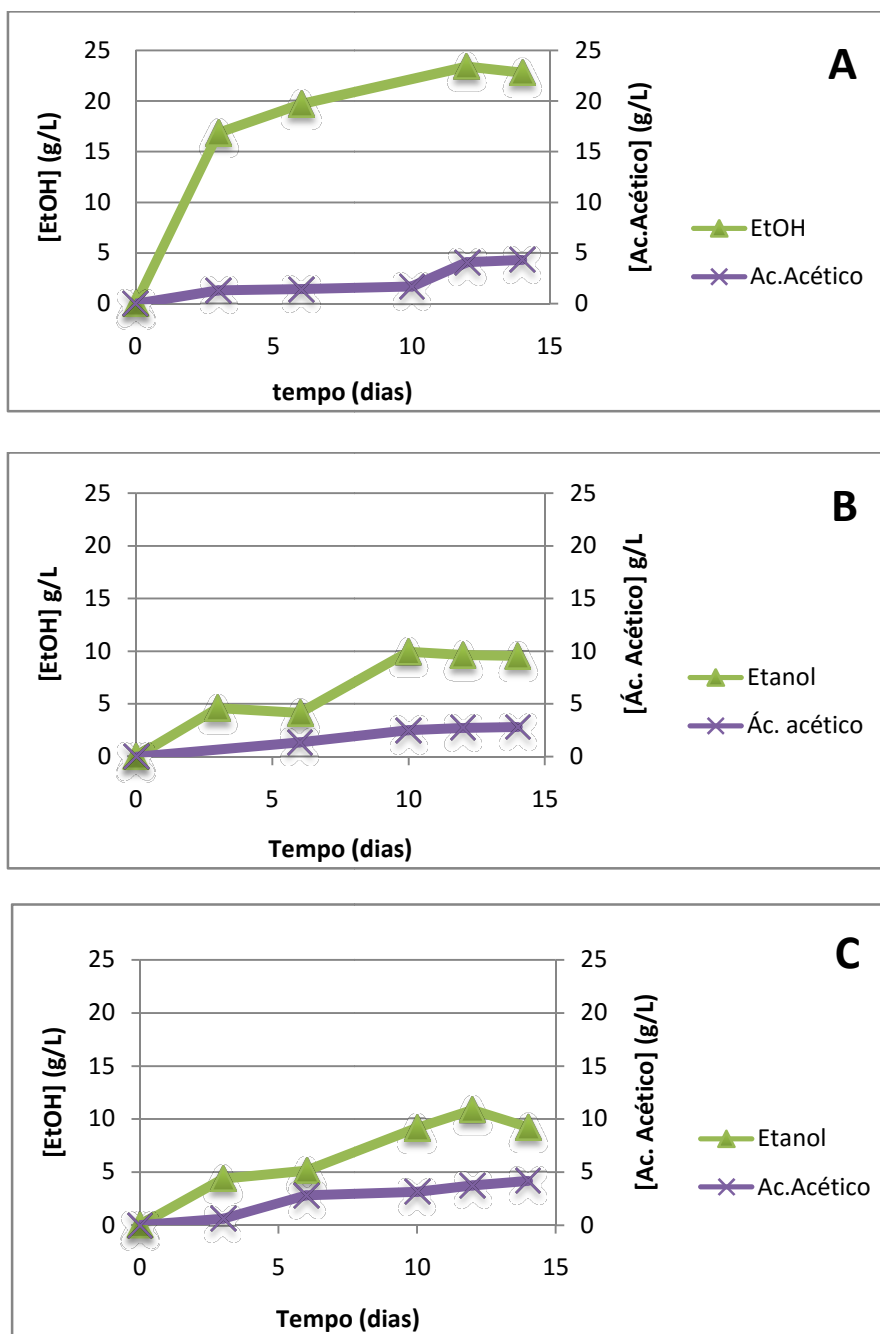


Figura 13 - Concentração de etanol e ácido acético ao longo da fermentação de chá inoculado com levedura imobilizadas. (A) 8%, (B) 10% e (C) 12% sacarose inicial.

Tal como no caso do glicerol, a formação de ácido acético é consistente com o facto de estarmos perante uma fermentação alcoólica com elevadas concentrações de açúcar, em que poderão ocorrer desvio metabólico no sentido da produção deste composto, sobretudo numa situação como a presente em que não houve arejamento

da cultura. Apesar disso, as concentrações de ácido acético produzidas são relativamente elevadas face às referidas na literatura (Estela-Escalante *et al.*, 2012), razão pela qual não se poderá descartar a hipótese de ter ocorrido uma contaminação inadvertida por AAB.

Para além de levedura imobilizada efectuaram-se igualmente ensaios em que se usou uma outra levedura vínica, *S. cerevisiae* ISA1000, que foi inoculada em suspensão de forma a verificar se haveria alguma desvantagem na utilização da levedura imobilizada devido a fenómenos de menor taxa de transferência de substrato neste caso ou se, por outro lado, o facto de a levedura estar mais protegida de factores de stress seria uma vantagem. Os resultados referentes a estas fermentações encontram-se apresentados na Figura 14.

Em comparação com a fermentação da formulação homóloga inoculada com levedura imobilizada ProElif (Figura 11), a formulação com levedura em suspensão (Figura 14) apresenta também uma acentuada descida da concentração de açúcares nos primeiros dias do processo fermentativo, diminuindo depois o seu consumo. No entanto, neste caso, o consumo nos primeiros dias não é tão acentuado como o observado no caso da levedura imobilizada. Como seria de esperar, em simultâneo com o consumo dos açúcares por parte da levedura, existe produção de etanol, sendo notória a diferença de concentração final deste constituinte entre a amostra inoculada com a ISA1000 (inferior a 8g/L) e a amostra inoculada com levedura imobilizada ProElif (cerca de 23g/L em 8% de sacarose e 10% nos outros dois casos). Saliencia-se também a velocidade mais lenta da produção de etanol, bem como o facto de que quer a glucose quer a frutose não se esgotam no final do período de análise. Estas diferenças poderão resultar do facto de no caso da levedura imobilizada esta se encontrar mais protegida de potenciais factores de stress como por exemplo o stress osmótico o que permite que o seu metabolismo seja menos afectado e consequentemente haja maior produção de etanol sem que tal implique uma paragem de fermentação. Apesar disso, ao contrário do que aconteceu no caso da levedura imobilizada, no caso da levedura em suspensão os níveis de glicerol observados foi praticamente nulos e os níveis de ácido acético (Figura 15) foram igualmente menores do que os observados com a levedura imobilizada.

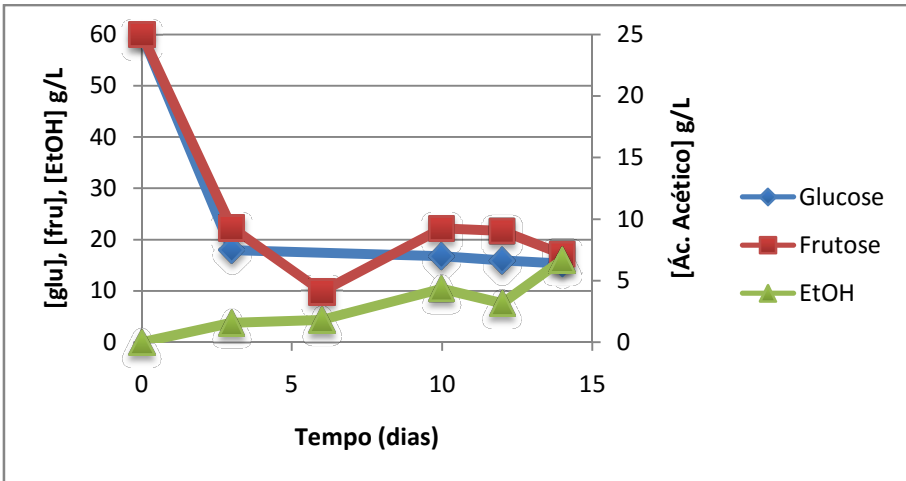
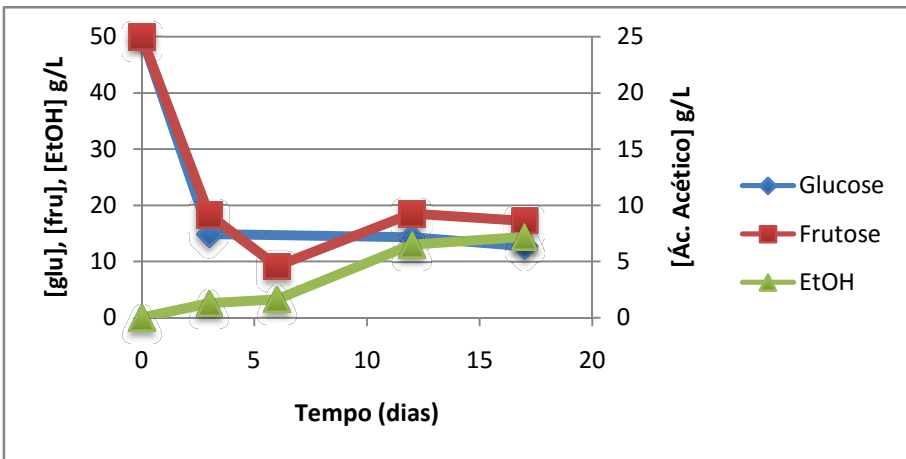
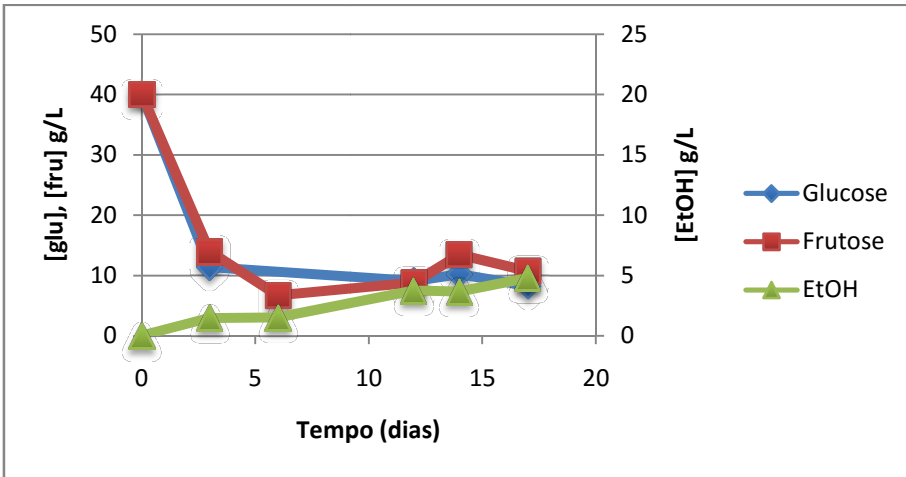


Figura 14 - Concentração de compostos ao longo de fermentação de chá inoculado com *S. cerevisiae* ISA1000 em suspensão. (A) 8%, (B) 10% e (C) 12% sacarose inicial.

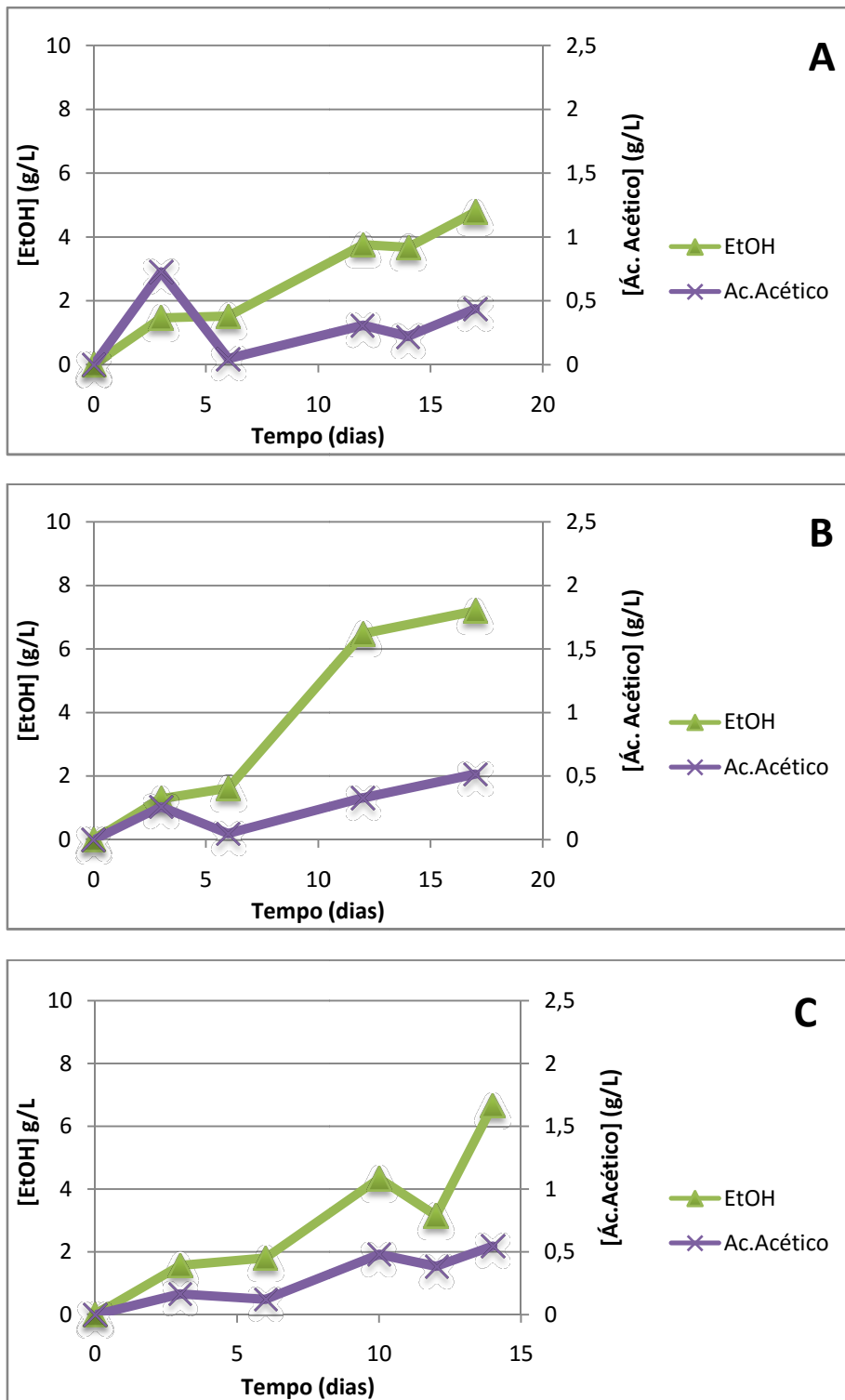


Figura 15 - Concentração de etanol e ácido acético ao longo da fermentação de chá inoculado com *S. cerevisiae* ISA1000 em suspensão. (A) 8%, (B) 10% e (C) 12% sacarose inicial.

Na generalidade, a fermentação realizada por levedura imobilizada permitiu o esgotamento dos açúcares e deu origem a uma maior quantidade de etanol, em todas as formulações utilizadas (8, 10 e 12% de sacarose), sendo mais evidente na

formulação de 8% de sacarose, levando a concluir que a imobilização não levou a uma redução significativa da taxa de transferência de substratos devido a problemas causados pela matriz de alginato. Nas amostras de formulações inoculadas com ISA1000, não houve esgotamento de açúcares, permanecendo ainda uma quantidade significativa deste no fim do período de análise. Estes resultados são ainda mais evidentes numa representação gráfica resumida comparativa das duas estirpes (Figura 16) que apresenta as concentrações finais para cada um dos compostos relevantes no âmbito deste trabalho.

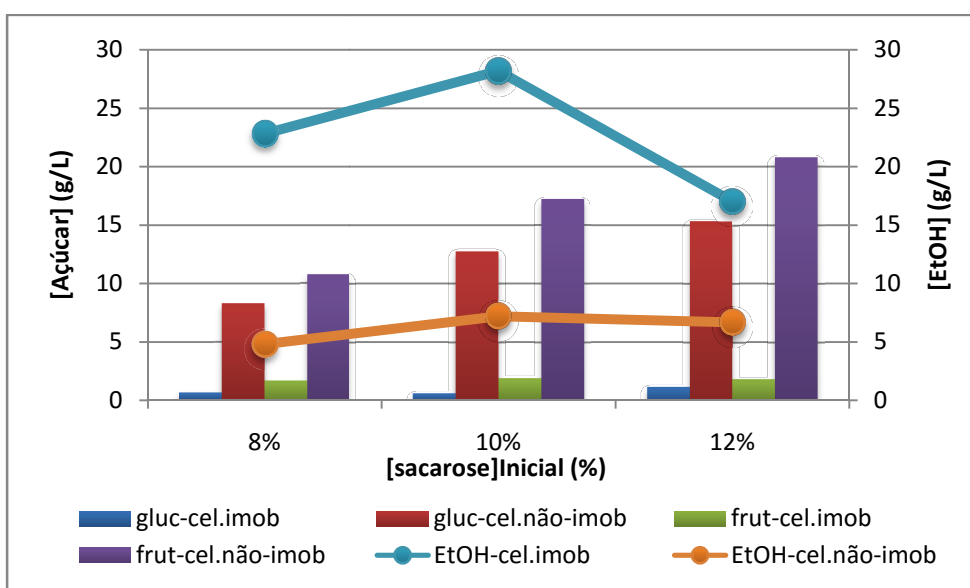


Figura 16 – Composição no final da fermentação alcoólica de chá fermentado com levedura ISA1000 e levedura imobilizada ProElif nas várias concentrações de sacarose inicial usadas.

Estes resultados favorecem a utilização da levedura imobilizada, mais prática, pois não é necessário realizar culturas, basta retirá-la da sua embalagem original e colocá-la no líquido a fermentar, e mais eficiente. Um outro aspecto a realçar no caso da utilização de levedura imobilizada é o facto de esta permitir obter líquidos fermentados muito mais límpidos e com maior probabilidade de serem aceites pelo consumidor, que espera encontrar no vinagre que daqui resulta, um líquido transparente.

4.1.2. Efeito da esterilização versus pasteurização do chá

Com o objetivo de verificar se haveria alterações no substrato (chá) caso este fosse autoclavado em comparação como chá pasteurizado efetuaram-se igualmente ensaios em que se inoculou cada um dos tipos de levedura (imobilizada e não imobilizada) no chá processado de ambas as formas (esterilizado e pasteurizado), seguindo-se a

fermentação ao longo do tempo. Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Figuras 17 e 18.

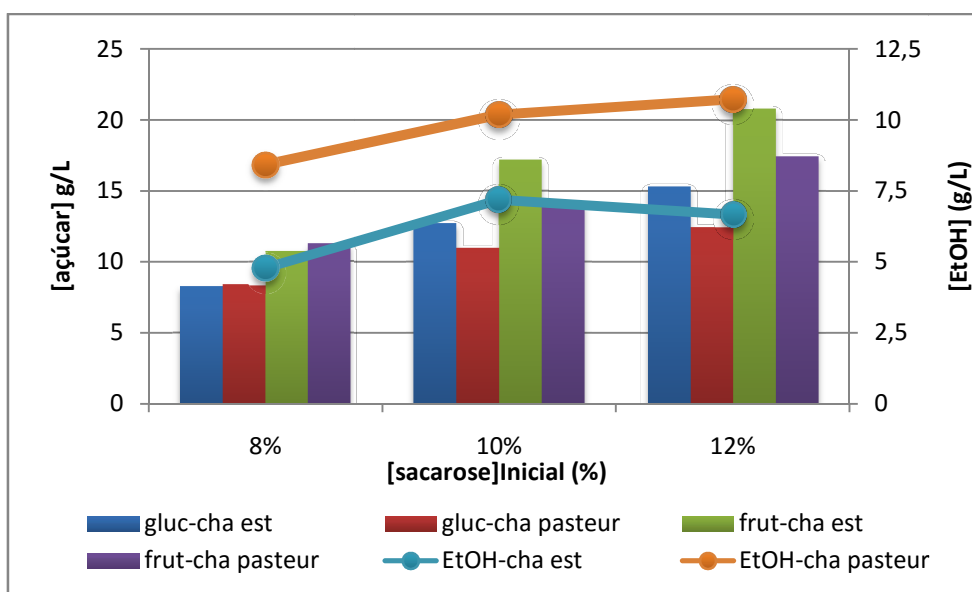


Figura 17 - Composição final de chás pasteurizado e esterilizado fermentados com *S. cerevisiae* ISA1000

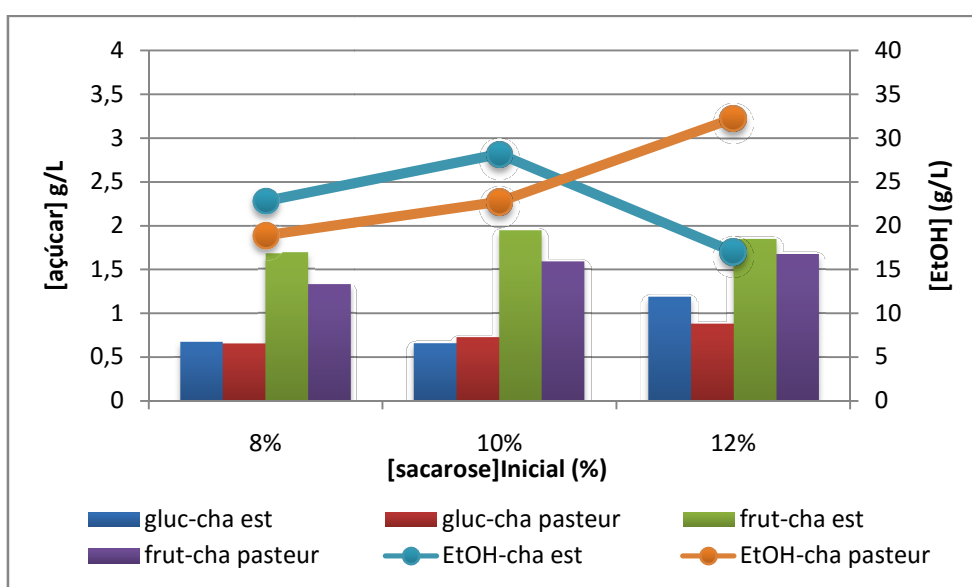


Figura 18 - Composição final de chás pasteurizado e esterilizado fermentados com levedura imobilizada

Pela análise dos gráficos é possível observar que tanto no caso da levedura imobilizada como no caso da levedura em suspensão, os valores residuais de glucose e frutose foram superiores no caso do chá esterilizado. Em relação aos valores de etanol verifica-se que estes são semelhantes ou superiores no caso do chá

pasteurizado. Estes resultados poderão ser explicados pelo facto de o processo de esterilização ter levado a uma degradação parcial de vitaminas e outros factores de crescimento, o que poderá ter implicações negativas no crescimento e metabolismo das leveduras. Atendendo a estes resultados, e tendo em conta que em nenhum dos casos em que se usou chá pasteurizado se observou contaminação relevante por bactérias, optou-se por continuar o trabalho com o chá processado de acordo com o procedimento mais simples “pasteurizado”, em que o chá é feito de acordo com os procedimentos mais convencionais, evitando assim esterilizar o chá sempre que se fazia um novo batch de chá fermentado.

Após os ensaios preliminares, e atendendo aos resultados descritos neste ponto, optou-se por realizar a primeira fermentação com levedura imobilizada ProElif, em chá preparado por métodos comuns. Em relação à concentração inicial de sacarose, mantiveram-se em aberto os ensaios com as três concentrações (8%, 10% e 12% de sacarose) uma vez que os resultados obtidos em termos de rendimento de produção de etanol foram semelhantes.

4.2 – Ensaio para avaliação do processo de produção de vinagres

Após a seleção do método mais adequado para a primeira fermentação (produção de etanol) prosseguiu-se o trabalho, realizando uma segunda fase de oxidação com o fim de converter o etanol produzido em ácido acético e assim obter vinagre.

Neste segundo passo inocularam-se os chás fermentados com dois inóculos, um inóculo proveniente de kombucha (mãe da kombucha e suspensão) e um inóculo proveniente de vinagre (mãe do vinagre e suspensão) e seguiu-se o processo ao longo de 15 dias.

Neste caso, utilizaram-se dois consórcios de microrganismos diferentes, ambos com bactérias acéticas mas em que, no caso do consórcio da kombucha estão igualmente presentes leveduras resistentes a ácido acético como *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, ou espécies não patogénicas do género *Candida*.

As diferenças nos dois consórcios microbianos inoculados refletem-se no tipo de compostos de aroma que são produzidos, sendo a kombucha habitualmente mais complexa em termos aromáticos do que o vinagre, mesmo quando este é produzido

por processos tradicionais. A ideia de produzir vinagre com “mãe da kombucha” resultou pois de uma vontade de criar um produto mais diferenciado e de maior riqueza aromática que pudesse ser bem aceite pelo consumidor.

4.2.1. Avaliação sensorial primária

Como forma de avaliar preliminarmente cada um dos vinagres, realizou-se ao longo do período de oxidação por AAB, uma análise sensorial simples a cada um dos vinagres obtidos, apenas baseada no aspecto e odor, cujos resultados se encontram apresentados na Tabela 5. Esta avaliação foi feita em primeiro lugar com os vinagres de chá preto, tendo sido posteriormente alargada para vinagres de chá verde e de chá branco, numa segunda fase.

Tabela 5 - Avaliação sensorial primária

| Vinagre | Características |
|--------------------------------------|--|
| Chá preto com mãe de vinagre | Coloração vermelha Odor característico a vinagre Aspecto turvo |
| Chá preto com kombucha | Coloração amarela Odor leve a vinagre, com notas florais Aspecto límpido |
| Chá verde com mãe de vinagre | Coloração vermelha Odor característico a vinagre Aspecto turvo |
| Chá verde com kombucha | Coloração amarela Odor leve a vinagre, algo herbáceo Aspecto límpido |
| Chá branco com mãe de vinagre | Coloração vermelha Odor floral Aspecto turvo |
| Chá branco com kombucha | Coloração amarela Odor floral Aspecto límpido |

De um modo geral, pode afirmar-se que os chás fermentados inoculados com mãe de vinagre adquirem um odor característico a vinagre, embora menos acentuado que o aroma do vinagre de vinho, vinagre mais comum. O seu aspecto é turvo em resultado de se ter inoculado suspensão juntamente com a mãe o que levou ao crescimento microbiano e à turvação (Figura 19) . A cor vermelha pouco característica do chá deve-se à utilização de uma mãe de vinagre e suspensão de vinho tinto.

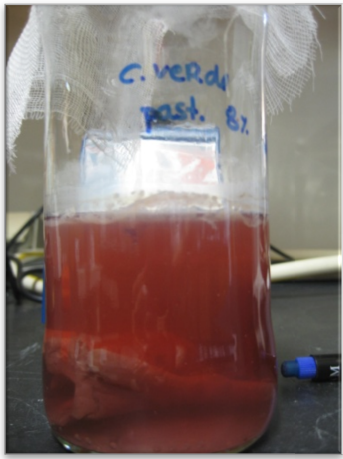


Figura 19– Chá fermentado inoculado com mãe de vinagre

Porsua vez, os chás fermentados inoculados com a mãe da kombucha apresentam um odor mais delicado, com notas florais bastante agradáveis, e um aspecto mais límpido com depósito no fundo, e cor amarela (Figura 20).



Figura 20 - Chá fermentado inoculado com mãe de kombucha

Como nesta fase de análise de cor e aroma não se detectou nenhuma amostra com características indesejáveis, resolveu-se prosseguir o trabalho não excluindo nenhuma amostra.

4.2.2 - Análise Composição Química por HPLC

Do mesmo modo que as amostras relativas à etapa da fermentação alcoólica foram analisadas por HPLC de forma a poder observar-se e quantificar-se a presença (ou ausência) de alguns compostos de interesse, o mesmo foi executado para as

amostras relativas à fase da oxidação acética, ou seja, após a inoculação com as mães de vinagre e de kombucha.

Na figura 21 são apresentados s resultados obtidos para a oxidação acética de chá preto fermentado com levedura imobilizada, a partir das três concentrações de sacarose iniciais.

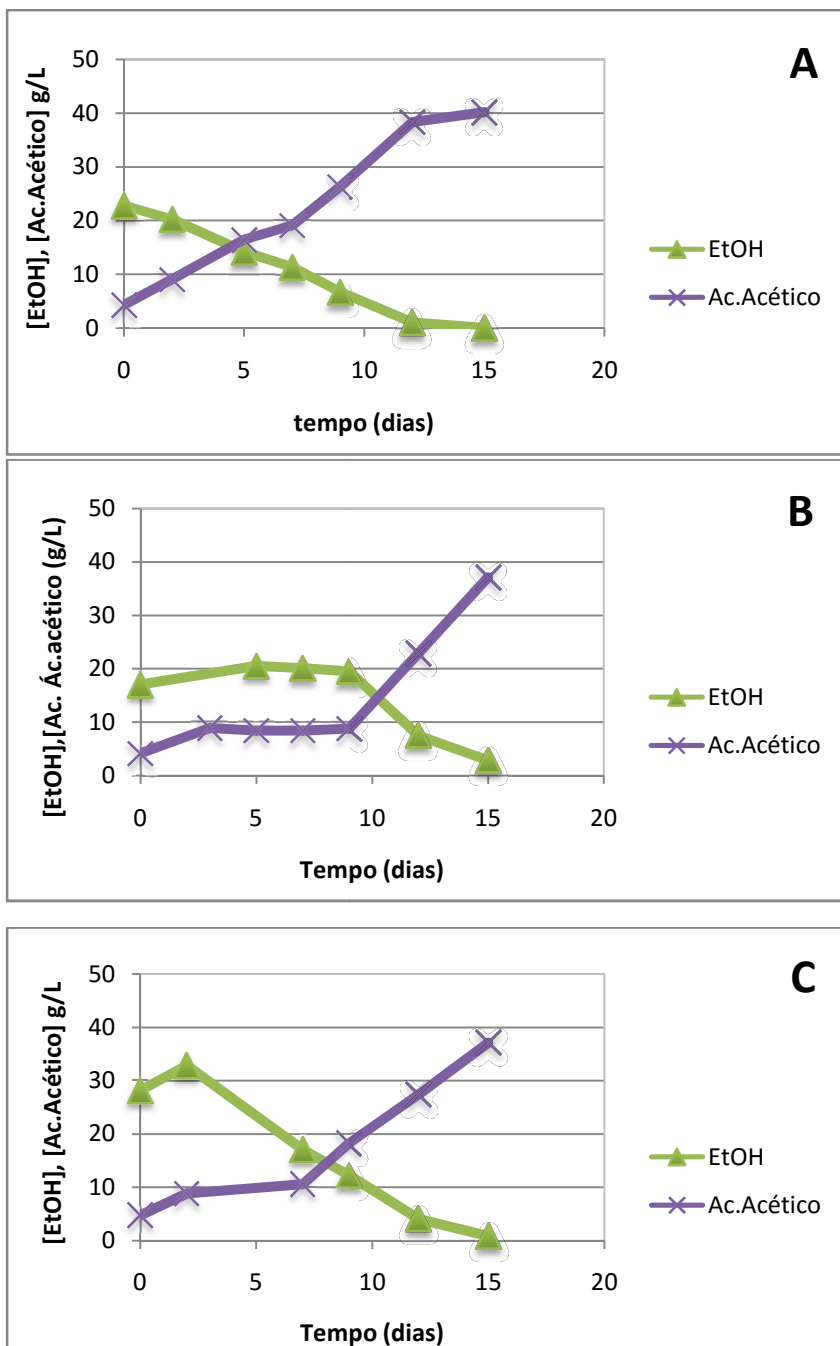


Figura 21 - Concentração de etanol e Ácido Acético ao longo da oxidação acética de chá preto fermentado com levedura imobilizada e inoculado com mãe do vinagre. (A)8%, (B) 10% e (C) 12% sacarose inicial.

A análise da Figura 21 permite observar que a partir do momento em que o chá fermentado é inoculado com a mãe de vinagre, a concentração de etanol começa a diminuir gradualmente, até valores muito próximos de zero quando se atinge o fim do período de análise. Esta é uma ocorrência expectável, uma vez que as bactérias acéticas estão a utilizar o etanol como substrato, produzindo por sua vez o ácido acético, cuja concentração aumenta à medida que a concentração de etanol diminui.

Nesta fase, no caso da concentração de 8% (Figura 21A), existem ainda alguma glucose e frutose residual que não foram previamente fermentadas pela levedura. Uma causa provável para a existência destes compostos no vinagre produzido é uma inibição da atividade da levedura por ação da elevada concentração de etanol presente no líquido fermentado. A situação nas formulações com 10 e 12% de sacarose inicial (Figuras 21B e Figura 21C) apresenta bastantes semelhanças com a formulação de 8% (Figuras 21A), sendo que a principal diferença assenta num rendimento ligeiramente menor em ácido acético, quando comparados com a primeira formulação.

Relativamente ao chá fermentado inoculado com a mãe da Kombucha, no caso do inóculo em chá fermentado com uma concentração inicial de 8% de sacarose, corresponde à concentração à qual a concentração de ácido acético foi maior. A partir do gráfico obtido (Figura 22A) verifica-se que apesar de no início do processo se observar um ligeiro aumento na concentração de etanol (Figuras 22), a partir dessa subida existe uma diminuição gradual que, tal como esperado, acontece em simultâneo com a produção de ácido acético, até ao esgotamento do etanol. Estas alterações devem-se à ação das bactérias acéticas, que convertem o etanol em ácido acético. De notar a presença de açúcares, que ao longo do tempo também diminuem, possivelmente por ação de alguma pequena população de leveduras que permaneceu no produto.

Relativamente às restantes duas formulações (Figura 22B e 22C), estas apresentam semelhança de resultados entre si. Também nestas situações se verifica um curto período de aumento da concentração de etanol – devido à presença de açúcares na amostra e sua metabolização – havendo depois uma diminuição gradual da presença do álcool, até ao seu esgotamento. Em simultâneo, ocorre a produção de ácido acético. No entanto, nestes dois casos, a produção de ácido acético é bastante inferior quando comparada com o vinagre de kombucha com os iniciais 8% de sacarose.

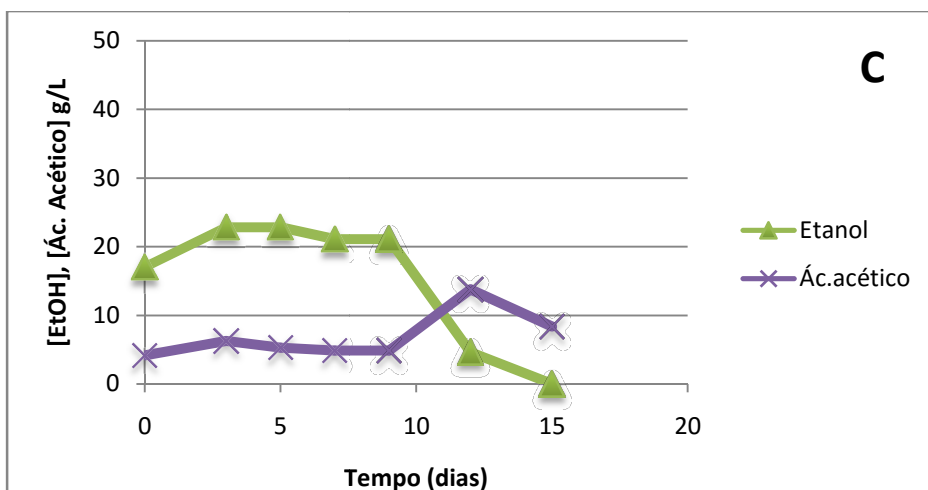
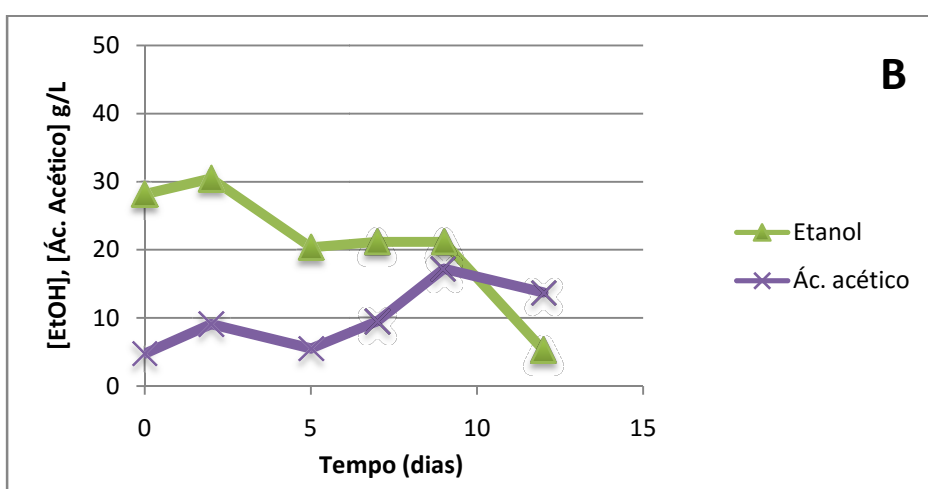
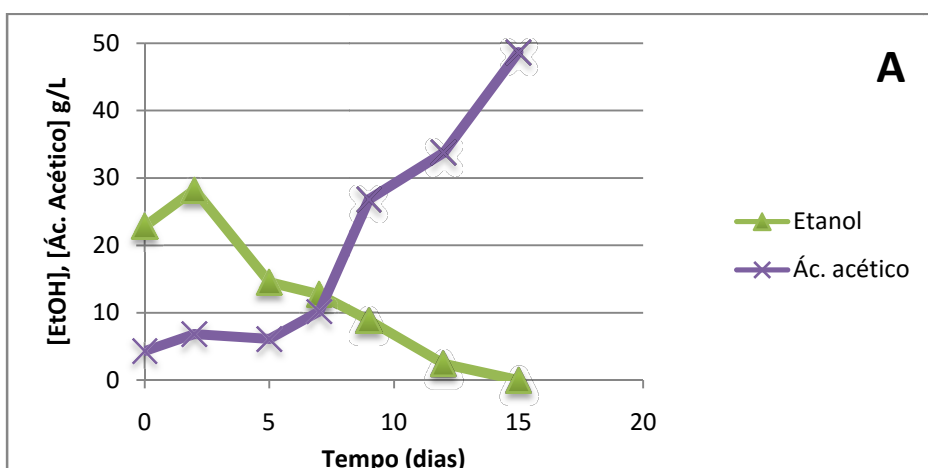


Figura 22 - Concentração de etanol e Ácido Acético ao longo da oxidação acética de chá preto fermentado com levedura imobilizada e inoculado com mãe da kombucha. (A) 8%, (B) 10% e (C) 12% sacarose inicial.

Como forma de resumir os principais resultados anteriormente apresentados, a Figura 23 compara os valores de concentração final em etanol e ácido acético nos vinagres e vinagres de kombucha produzidos.

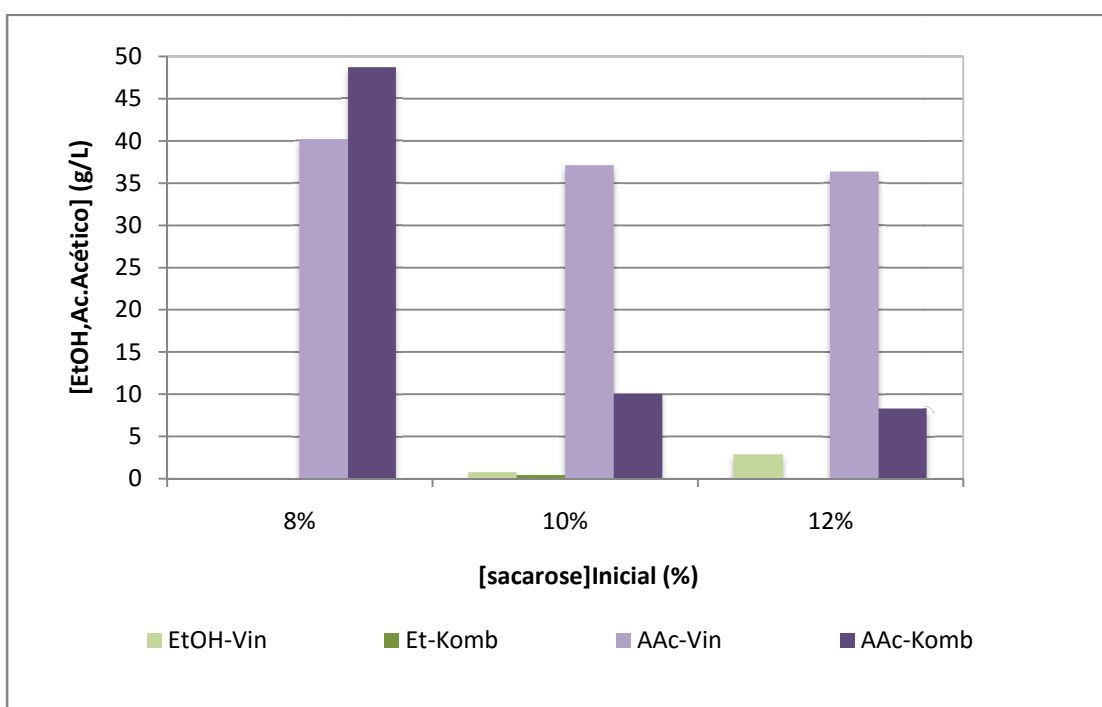


Figura 23 - Concentração final de etanol e ácido acético em vinagre e vinagre de kombucha de chá preto

No final da fase da oxidação acética, existem pequenas quantidades de etanol no vinagre e vinagre de kombucha com 10% de sacarose inicial, e no vinagre com 12% de sacarose inicial, que apresenta um valor um pouco superior.

Na formulação feita com 8% de sacarose inicial não foi detectada a presença de etanol, que foi utilizado pelas bactérias acéticas, formando ácido acético. Neste caso concreto, a quantidade de ácido acético formado é superior em comparação com as duas outras formulações, e é de se salientar que, contrariamente ao que sucede nas outras duas, existe uma quantidade superior de ácido acético no vinagre de kombucha do que no vinagre propriamente dito.

As formulações de 10 e 12% apresentam valores de ácido acético semelhantes entre si, com concentrações um pouco superiores a 35g/L para os vinagres e próximos de 10g/L para os vinagres de kombucha.

Após análise dos resultados obtidos e de uma observação do desenvolvimento da oxidação acética, decidiu-se prosseguir o trabalho apenas com as formulações que continha inicialmente 8 e 10% de sacarose, porque eram as que apresentavam

resultados mais interessantes. A formulação com 12% de sacarose foi eliminada, pois apresentava resultados muito semelhantes à de 10%, mas com utilização de maior quantidade de sacarose, o que implicava um custo maior de produção. A observação do decorrer do processo indicou também que nesta formulação havia dificuldade de formação de uma nova película celulósica (uma nova mãe de vinagre).

Concluída a análise de resultados para as formulações com chá preto, prosseguiu-se o trabalho para a obtenção de formulações de chá verde e chá branco, as quais foram também analisadas no decorrer do seu processo de oxidação acética.

A representação gráfica na figura 24 estabelece uma relação de comparação entre vinagres feitos a partir de chá preto, verde e branco.

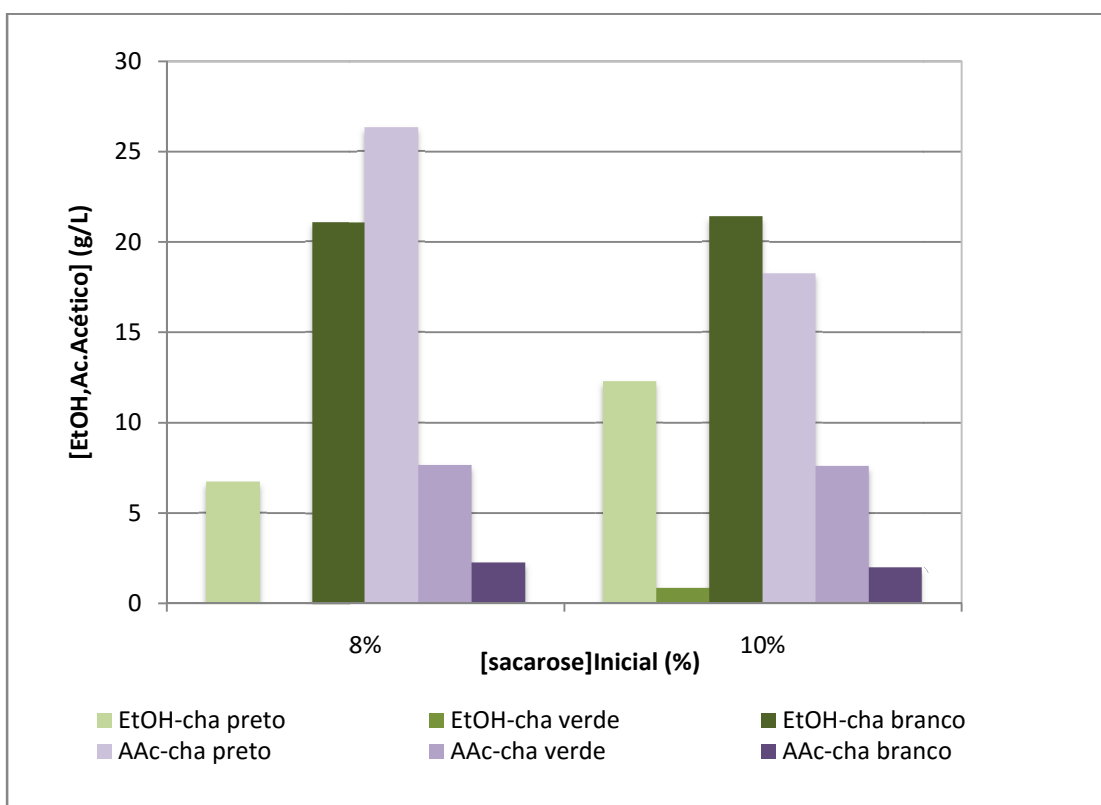


Figura 24 - Concentração de etanol e ácido acético ao fim de 10 dias de oxidação em vinagres de chá preto, verde e branco

Em ambas as formulações, é notório que a concentração em ácido acético presente nos vinagres feitos a partir de chá preto é largamente superior em relação aos produtos feitos com outro tipo de chás.

4.2.3. Evolução do pH

Como modo de auxiliar na diferenciação/seleção dos produtos mais adequados no âmbito deste trabalho para prosseguir com o passo de análise sensorial, foi realizada a medição do pH para cada um dos diferentes vinagres. Esta análise foi feita em duplicado, e os valores apresentados na tabela 6 são uma média dos valores obtidos.

Tabela 6 - Vinagres produzidos e seus valores de pH

| Produto | pH |
|---|-----------|
| Chá preto 8% sacarose vinagre | 2,99 |
| Chá preto 10% sacarose vinagre | 2,995 |
| Chá preto 8% sacarose vinagre de kombucha | 2,39 |
| Chá preto 10% sacarose vinagre de kombucha | 2,665 |
| Chá verde 8% sacarose vinagre | 2,845 |
| Chá verde 10% sacarose vinagre | 2,795 |
| Chá verde 8% sacarose vinagre de kombucha | 2,77 |
| Chá verde 10% sacarose vinagre de kombucha | 2,825 |
| Chá branco 8% sacarose vinagre | 2,94 |
| Chá branco 10% sacarose vinagre | 3,595 |
| Chá branco 8% sacarose vinagre de kombucha | 2,87 |
| Chá branco 10% sacarose vinagre de kombucha | 2,825 |

A observação do Tabela 6 permite verificar que os valores de pH de todas as amostras se encontram num intervalo de 2,6-3,6 e que as amostras inoculadas com mãe de kombucha apresentam, na generalidade, valores de pH inferiores às amostras inoculadas com mãe de vinagre. Na formulação de vinagre de chá preto, esta ocorrência é corroborada pela análise por HPLC realizada às amostras (Figura 24), onde é visível uma concentração de ácido acético superior no vinagre de kombucha, quando comparado com o vinagre. No entanto, para as formulações de 10%, o que se observa é o inverso, uma concentração de ácido acético superior no vinagre. Tendo em conta que para além do ácido acético podem ser produzidos outros ácidos orgânicos por parte quer das bactérias acéticas quer das leveduras, é possível que os valores de pH observados nos vinagres de kombucha resultem da presença de outros ácidos (que não o acético) que não foram quantificados no presente trabalho.

4.3. - Identificação da microbiota do vinagre de chá

Com vista à identificação molecular da microbiota presente no processo de produção de vinagres inocularam-se amostras recolhidas no final do passo de oxidação em meio sólido, tendo-se observado três tipos diferentes de morfologias. As colónias diferentes foram isoladas e extraiu-se DNA genómico de forma a ser possível identificar os isolados por PCR com primers específicos para a região 16S rDNA (AC1 e AC3) de bactérias acéticas.

Após reação de PCR, visualizou-se o DNA amplificado por electroforese em gel de agarose (Figura 25). Da análise do gel obtido é possível observar 3 bandas com o tamanho aproximado ao tamanho previsto tendo em conta a localização dos primers usados (1000pb) (Chettri e Tamang, 2015).



Figura 25 - Electroforese em gel de agarose realizada ao produto de PCR

Os produtos de PCR foram sequenciados e comparados com as sequências disponíveis nas bases de dados de livre acesso. A análise Blast permitiu identificar duas das bactérias presentes mas não foi no entanto possível identificar a terceira bactéria devido a problemas relacionados com a amostra de DNA.

Das duas bactérias identificadas, uma delas corresponde a uma estirpe de *Gluconoacetobacter xilinum*, uma bactéria acética comum em vinagres e responsável pela formação da película de celulose. Já a segunda, corresponde com 99% de probabilidade a uma estirpe de *Oceanobacterium sojiae*, uma espécie anteriormente isolada de resíduos de soja fermentada e outros produtos fermentados, e cujo género é habitualmente encontrado noutros produtos fermentados nomeadamente produtos de origem vegetal.

4.4. – Análise sensorial - avaliação da preferência do consumidor

Anteriormente à fase da análise sensorial, todos os produtos foram sujeitos a uma operação de filtração, a fim de remover partículas em suspensão, através de um filtro de 0,45µm de diâmetro (Maine Manufacturing, LLC). Na fase final da realização deste trabalho, foi efectuada uma análise sensorial aos produtos obtidos.

Em primeiro lugar, efectuou-se uma análise sensorial primária com um painel de provadores experientes para determinar quais os produtos com maior potencial de aceitação em termos sensoriais. Os vinagres seleccionados e os respectivos códigos que lhes foram atribuídos encontram-se no Quadro 7.

Quadro 7 - Vinagres seleccionados para análise sensorial

| Vinagres | Código da amostra |
|--|--------------------------|
| Vinagre de kombucha de Chá preto 8% sacarose | A451 |
| Vinagre de kombucha de Chá preto 10% sacarose | A622 |
| Vinagre de kombucha de Chá verde 10% sacarose | A370 |
| Vinagre de kombucha de Chá branco 10% sacarose | A564 |
| Vinagre de Chá preto 8% sacarose | A283 |
| Vinagre de Chá verde 8% sacarose | A739 |

Após a seleção preliminar em que se excluiu as formulações com menor potencial ou maior custo, os seis vinagres seleccionados foram sujeitos a provas por um painel de consumidores. Todos os vinagres presentes foram dados a provar numa emulsão com azeite refinado, numa proporção de 1 parte de vinagre para 3 partes de azeite, para simular a vulgar utilização do vinagre como tempero ou como é comumente servido em alguns restaurantes. A utilização do azeite refinado resultou do facto de este ser caracteristicamente inodoro, dando a gordura/maciez mas não mascarando o sabor/aroma do vinagre a testar

Para efeitos de comparação, e de forma a perceber se os resultados eram ou não influenciados pelo facto de o consumidor não gostar de vinagres, foi adicionada ao teste uma amostra de vinagre de vinho branco comercial com 6,5% de acidez – código de amostra A812.

O painel de utilizado foi constituído maioritariamente por elementos do sexo feminino (73%), com apenas 27% de provadores de género masculino (figura 25). Em relação à composição etária (Figura 26), a maioria dos provadores inseria-se na faixa dos 20-29 anos.

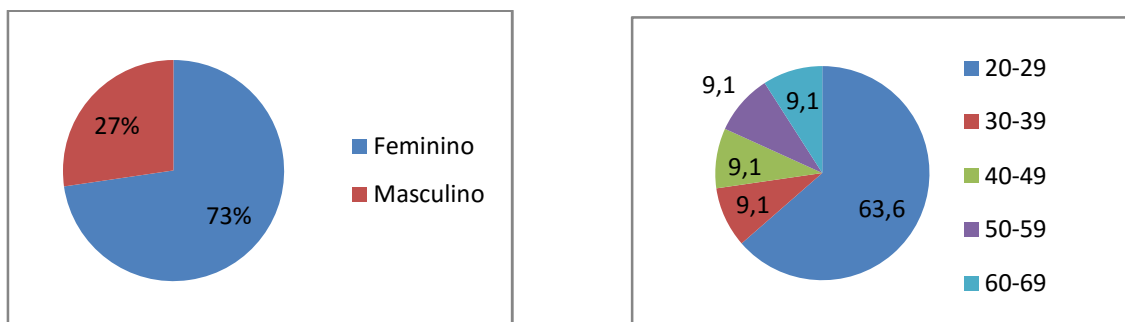


Figura 26 - Género do painel de provadores**Figura 27 - Composição etária do painel de provadores**

A ficha de prova apresentava os códigos das amostras e pedia para os provadores avaliarem, dando pontuação de 1 (desgosto extremamente) a 5 (gosto extremamente) a diversos critérios como aspecto, cor, aroma e o sabor acético, em que neste último foi dado aos consumidores a indicação de que 1 (extremamente intenso) e 5 (extremamente suave). Os provadores foram ainda questionados em relação à intenção de compra de cada um dos produtos. Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Figuras 28 a 31. Atendendo aos resultados, verifica-se que análise das características sensoriais permite distinguir, em relação à cor, os vinagres de chá preto com 8% de sacarose (A283) e de chá verde com 8% de sacarose (A739), sendo o primeiro o mais interessante pela sua cor rosada muito agradável (Figura 28).

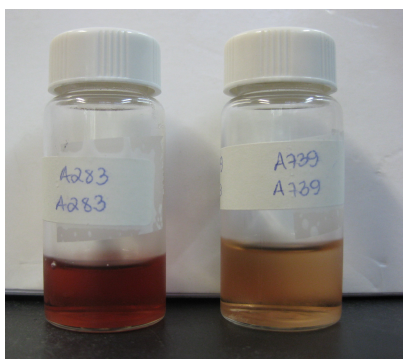


Figura 28 - Amostras de vinagre A283 e A739

No critério aroma, destaca-se a amostra A622 (vinagre de kombucha de chá preto com 10% de sacarose) o que vem ao encontro da sugestão de utilização do inóculo de kombucha como forma de acrescentar riqueza aromática aos vinagres produzidos. Relativamente ao sabor acético, a amostra de vinagre de chá preto com 8% de sacarose (A283) foi a única que apresentou este descritor semelhante ao do vinagre de vinho comercial (A812). É curioso realçar que a percepção da acidez (ácido acético) não coincide com o fato de as amostras apresentarem concentrações de ácido acético mais elevadas, como se pode observar comparando os dados apresentados na Figura 23 com os dados da Figura 28. Por exemplo, com base nos dados, a formulação com maior concentração de ácido acético determinado por HPLC foi a produzida com o inóculo de kombucha a partir de chá preto fermentado com 8% - A451 - (Figura 23), tendo sido esta a formulação em que a percepção de ácido acético foi menos acentuada, seguindo-se a formulação em que se utilizou também inóculo proveniente de kombucha em chá fermentado com 10% de sacarose. Este facto poderá estar relacionado com uma maior riqueza de aromas e sabores resultante do metabolismo do consórcio de leveduras e bactérias acéticas face à situação em que apenas estão presentes bactérias acéticas, que poderá mascarar o aroma/sabor acético nestas formulações, muito embora no caso da formulação A451, o seu aroma não seja considerado particularmente agradável.

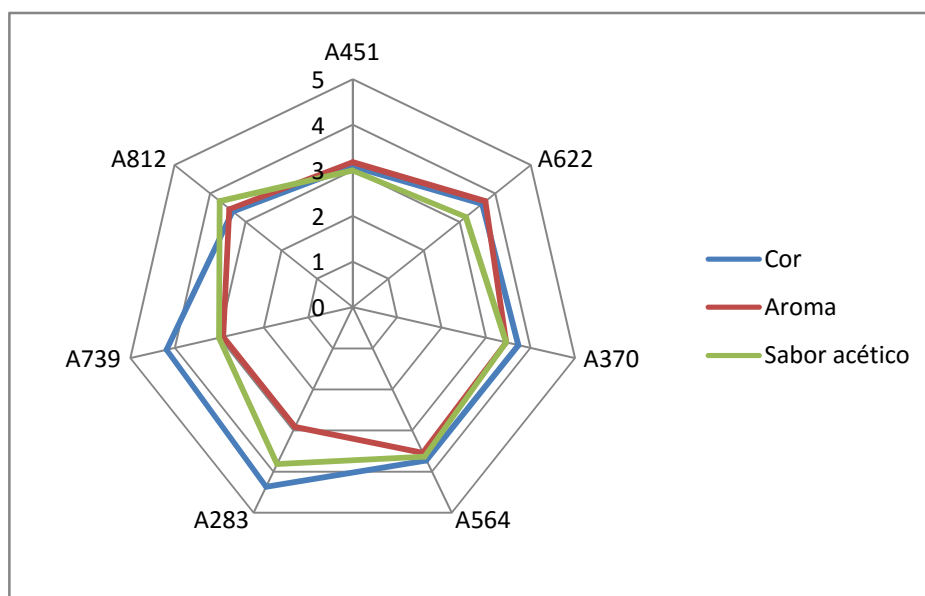


Figura 29 - Avaliação das principais características sensoriais

Como medida de avaliação global, o critério de apreciação global demonstra que os produtos preferidos pelos consumidores foram o A370 (vinagre de kombucha de chá

verde com 10% de sacarose) e o A283 (vinagre de chá preto com 8% de sacarose) (Figura 30). Comparando com os resultados obtidos para os três parâmetros inquiridos (Figura 29), verifica-se que estes dois vinagres são apreciados de forma diferente relativamente a estes parâmetros, sendo os resultados para A370 muito mais próximo dos resultados obtidos para o vinagre de vinho comercial (A812) e A283 mais afastado em relação a este quer na cor quer no aroma, o que leva a colocar a hipótese pensar que teremos dois grandes grupos de consumidores, um grupo apreciador de vinagre tradicional e que selecionou como preferido A370 e um grupo mais apreciador da diferença e/ou menos apreciador de vinagre tradicional de vinho que preferiu a formulação mais diferenciada em relação ao gosto tradicional.

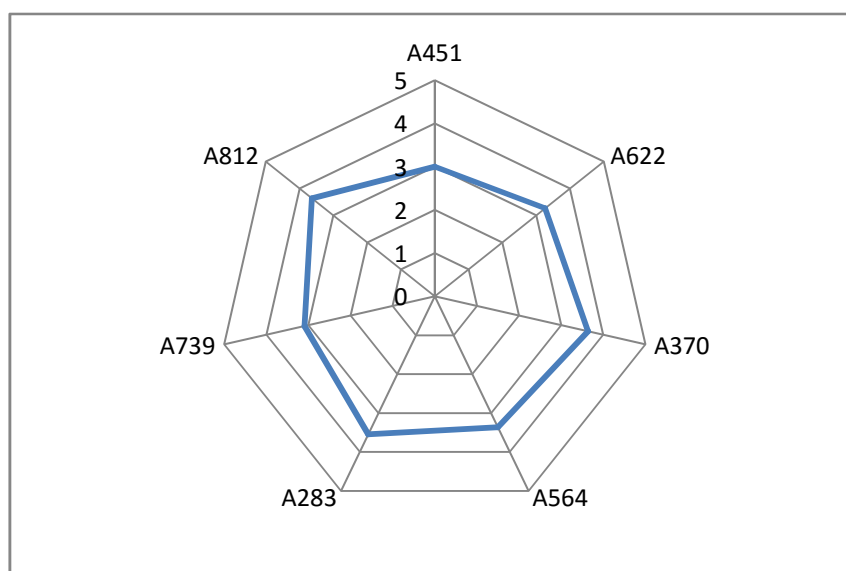


Figura 30 - Apreciação global

Em relação à intenção de compra para facilitar a análise gráfica estabeleceu-se (Quadro 8) uma equivalência entre cada uma das hipóteses e um valor estipulado.

Quadro 8 - Correspondência entre intenção de compra e valor estipulado

| Intenção de compra | Valor estipulado |
|------------------------------|-------------------------|
| De certeza que não compraria | 1 |
| Provavelmente não compraria | 2 |
| Talvez comprasse | 3 |
| De certeza que compraria | 4 |

Tendo em conta os resultados expressos em termos deste valor (Figura 31), verifica-se que não é possível afirmar que haja uma intenção clara de compra o que se pode

traduzir pela inexistência de uma aceitação clara dos produtos por parte dos consumidores inquiridos. Tal aconteceu mesmo no caso do vinagre comercial (A812) muito embora seja de realçar que todas as amostras apresentam aceitação igual ou ligeiramente superior à atribuída ao vinagre comercial, o que leva a pensar que os vinagres produzidos poderiam ser tão ou melhor aceites que este no mercado. Um outro factor que poderá ter contribuído para a menor intensão de compra é o padrão etário da maioria dos inquiridos, que sendo maioritariamente jovens poderão não ser os indivíduos que têm a seu cargo a compra de bens alimentares para o agregado familiar, sobretudo tendo em conta que o vinagre é considerado em Portugal um produto alimentar comum. Uma outra questão que poderá contribuir para a menor aceitação de produtos deste tipo é o facto de, em Portugal e com exceção do vinagre balsâmico, o vinagre estar habitualmente conectado com produtos de baixo custo, de uso corrente e pouco elaborados, só agora se começando a introduzir no mercado produtos de qualidade e de carácter mais *gourmet*.

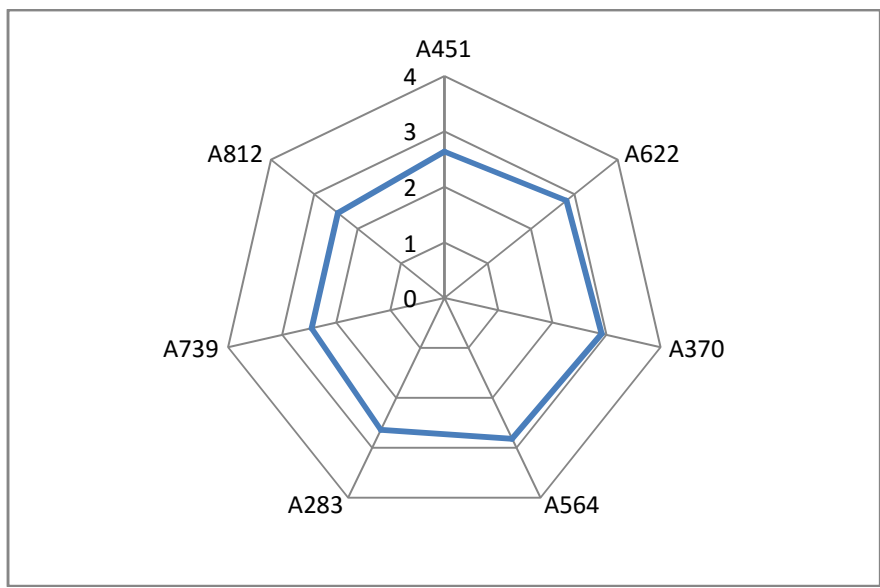


Figura 31 - Intenção de compra dos produtos

5 – Considerações finais e perspectivas de futuro

A produção de vinagre a partir de chá açucarado engloba duas fases essenciais: em primeiro lugar, uma fermentação alcoólica promovida por *S. cerevisiae*, que visa a metabolização dos açúcares presentes (sacarose/glucose+frutose), com produção de etanol; em segundo lugar, uma oxidação realizada por bactérias acéticas, que converte o etanol em ácido acético.

Os primeiros ensaios efectuados tiveram como objectivo estabelecer qual o processo mais apropriado para o decorrer da fermentação alcoólica, comparando diferentes estirpes de leveduras e métodos. Os resultados obtidos indicaram que o chá pasteurizado inoculado com levedura imobilizada ProElif foi aquele em que se obteve um melhor rendimento em termos de produção de etanol, com maior celeridade e facilidade de utilização.

Prosseguindo para a etapa seguinte, os chás fermentados foram metade deles inoculados com a cultura mãe de vinagre e a restante metade com cultura mãe de kombucha, tendo-se observado o desenrolar do processo de oxidação por bactérias acéticas. A análise dos resultados obtidos apontou no sentido da eliminação das formulações com 12% de sacarose inicial, não por questões sensoriais mas apenas atendendo a questões de custo, uma vez que estas apresentavam resultados muito semelhantes aos das formulações com 10% inicial de sacarose.

Posto isto, as formulações selecionadas foram alvo de uma avaliação sensorial primária, realizada por um painel de provadores treinado, na qual se selecionaram seis (os vinagres de kombucha de chá preto com 8 e 10% iniciais de sacarose, vinagre de kombucha de chá verde com 10% inicial de sacarose, vinagre de kombucha de chá branco 10% inicial de sacarose, e os vinagres de chá preto e chá verde, ambos com 8% inicial de sacarose), por apresentarem características mais interessantes.

A etapa de avaliação sensorial realizada por consumidores ditou que, em termos globais, as amostras preferidas foram a A283 (que também possui a coloração mais apelativa) e a A370 (que apresenta uma boa pontuação em termos de cor, aroma e sabor acético). Apesar de o critério da intenção de compra dos consumidores não ter obtido resultados positivos, todas as amostras avaliadas apresentaram resultados de aceitação igual ou ligeiramente superior à obtida pelo vinagre comercial, o que indica que os vinagres produzidos poderiam ser tão ou melhor aceites pelo consumidor.

Adicionalmente, foram utilizadas técnicas de identificação de microrganismos para a caracterização da microbiota do vinagres, através das quais foram detectados dois microrganismos, *Gluconoacetobacter xilinum*, uma AAB cuja presença em vinagre é comum, e *Oceanobacterium sojiae*, habitual em produtos fermentados.

Relativamente a perspectivas para o futuro, existem diversas ideias que seriam interessantes no âmbito deste trabalho quer em termos da análise mais aprofundada dos processos quer em termos de produto.

Por uma lado, seria interessante avaliar o perfil aromático dos vinagres produzidos com base no inóculo proveniente de kombucha, comparando-o com o do vinagre produzido com a mãe do vinagre bem como uma análise detalhada aos restantes compostos presentes nestes produtos (nomeadamente a quantificação de ácidos orgânicos que não o acético). Um outro aspecto a explorar seria observar qual é a evolução da microbiota ao longo deste processo. Seria igualmente interessante, uma vez identificados os microrganismos que participam no processo de oxidação do chá fermentado a vinagre, investigar quais as contribuições individuais destes para as características sensoriais do produto obtido e até que ponto o consórcio de microrganismos é determinante para o produto final.

Em relação ao produto final, e para que este entre no mercado, será necessário não só melhorar alguns aspectos sensoriais como depois de afinadas as formulações realizar um estudo da estabilidade dos produtos ao longo de 6 meses, de forma a compreender o comportamento dos vinagres na sua embalagem, e determinar a necessidade ou não, de conservantes ou estabilizantes. seriam possivelmente os próximos a ser realizados.

Posteriormente, e no sentido de produzir numa escala maior, será necessário realizar um estudo para o aumento da produção para escala industrial, no sentido de utilizar métodos adequados de produção, que assegurem a sua qualidade e rentabilidade para o produtor.

6 – Bibliografía

Ahmed, S., Stepp, J. R., 2013, Green Tea: The Plants, Processing, Manufacturing and Production, in Preedy, V. R. (Editor), Elsevier Inc., pp.19 – 32.

Basu, A., Lucas, E. A., 2007, Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health, Nutrition Reviews, vol. 65, páginas 361 – 375.

Bukowski, J. F., Percival, S. S., 2008, L-Theanine intervention enhances human $\gamma\delta$ T lymphocyte function, Nutrition Reviews, 66: 96 – 102.

Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R., 2011, Molecular Wine Microbiology, Elsevier Inc.

Chang, K., 2015, World Tea Production and trade – Current and future development, FAO, pp. 4 – 6.

Chettri, R., Tamang, J. P., 2015, Bacillus species isolated from tungrymbai and bekgang, naturally fermented soybean foods of India, International Journal of Food Microbiology, 16,197:72-6.

Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J.A., Oro, L., Rodrigues, A.J., Gonzalez, R., 2016. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. Frontiers in Microbiology, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00642

Costa, A. I. A. e Jongen W. M. F., 2006, New Insights into consumer-led food product development, Trends on Food Science & Technology, 17: 457 – 465.

Decreto-Lei número 174/2007 de 8 de Maio

Dufresne, C., Farnworth, E., 2000, Tea, Kombucha and Health: a review, Food Research International, 33: 409 – 421.

Estela-Escalante, W., Rychtera, M., Melzoch, K., & Hatta-Sakoda, B.. 2012, Effect of aeration on the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae* cultured in apple juice. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 11(2): 211 – 226.

Fellows, P. J., Food Processing Technology – Principles and Practice, 1996, 1997, Woodhead publishing Limited.

Fuller, G. W., 2011, New Food Product Development – From Concept to Marketplace, 3rd Edition, CRC Press.

Gancedo, J. M., Gancedo, C., 1986, Catabolite repression mutants of yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 32: 179-187.

Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A. A., Clark, I., Nino, I., Gosset, G., Martinez, A., 2004, Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63 (6): 734-741.

Graves, T., Narendranath, N., Dawson, K., Power, R., 2006, Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33 (6): 469-474.

Gullo, M., Verzelloni, E., Canonico, M., 2014, Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects, *Process Biochemistry*, 49: 1572 – 1577.

Jäger, A. K., Saaby, L., 2011, Flavonoides and the CNS, *Molecules*, 16: 1471 – 1485.

Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Sathishkumar, M., 2014, A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity and Tea Fungus, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 538 – 550.

Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Ajandouz, E. H., 2012, Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion, *Food Research International*, 49: 226 – 232.

Kotler, P., Armstrong, G., 2004, *Estratégia de comunicação integrada de Marketing*, 8ª edição, São Paulo, Prentice Hall, 2004.

Kumar, R. S. S., Murugesan, S., Kottur, G., Gyamfi, D. , 2013, in *Tea in Health and Disease Prevention*, editado por Preedy, V. R., Elsevier Inc., cap. 4, pp. 41 – 58.

Lagunas, R., 1993, Sugar Transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Reviews*, 104: 229 – 242.

Laranjeira, C. M. C., 1998, *Introdução Monográfica à Indústria Vinagreira – Aproveitamento de Vinhaços de Aguardentes Vínicas em Acetificação: um valor de opção para a Indústria Vinagreira*, Dissertação para obtenção do grau de Mestre, cap. 2 e 9.

Lawless, H. T., Heimann, H., 2010, Sensory Evaluation of Food – Principles and Practices, Second Edition, Springer Science + Business Media, LLC, cap. 1, pp. 1 – 17.

Malbaša, R., Lonkar, E., Djuric, M., 2008, Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses, Food Chemistry, 106: 1039 – 1045.

Mao, J. T., 2013, in Tea in Health and Disease Prevention, editado por Preedy, V. R., Elsevier Inc., cap. 3, pp. 33 – 40.

Meilgaard, M. C., Civille, G. V., Carr, B. T., 2007, Sensory Evaluation Techniques, Fourth Edition, Taylor & Francis Group, LLC, Cap. 1, pp. 1 – 5.

Obanda, M., Owuor, P.O., Mangoka, R., 2001, Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature, Food Chem, vol. 75, pág. 395 – 404.

Obanda, M., Owuor, P.O., Mangoka, R., Kavoi, M. M., 2004, Changes in thearubigin fractions and theaflavin levels due to variations in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total color, Food Chemistry, 85: 163 – 173.

Odegaard, A.O., Pereira, M. A., Koh, W. – P., Arakawa, K., Lee, H. – P., e Yu, M. C., 2008, Coffee, Tea and incident type 2 diabetes: The Singapore Chinese Health Study, American Journal of Clinical Nutrition, 88: 979 – 985.

Panagiotakos, D. B., Lionis, C., Zeimbekis, A., Gelastopoulou, K., Papairakleous, N., Das, U. N., Polychronopoulos, E., 2009, Long term tea intake is associated with reduced prevalence of (type 2) diabetes mellitus among elderly people from Mediterranean islands: MEDIS epidemiological study, Yonsei Medical Journal, 50: 31 – 38.

Pinto, M. S., 2013, Tea: A New Perspective on Health Benefits, Food Research International, 53: 558 – 567

Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., Setu, M., 2013, Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review, AKMMC 4(1), páginas 30-36

Rains, T. M., Agarwal, S., e Maki, K. C., 2011, Anti-obesity effects of green tea catechins: A mechanistic review, The Journal of Nutritional Biochemistry, 22: 1 – 7

- Rajeev, M., Rajappan, S. T., Balasubramanian, S., 2002, Effect of oxygen addition during fermentation on CTC black tea quality, in Rethinam, P., Khan, H. H., Mandal, P. K., *et al.*, (Editores), Plantation Crops Research and Development in the New Millenium Proceedings of Placrosym XIV, 2000, pp. 192 – 196.
- Ramasamy, V., Rajeev, M., Ramamoorthy, G., 2000, CTC Tea Manufacture . The United Planters' Association Southern India, Coonoor, Nilgiris, pp. 1 – 2.
- Ravichandran, R., 2002, Carotenoid composition, distribution and degradation to flavor volatiles during tea processing, *Food Chemistry*, 78: 23 – 28.
- Ravichandran, R., Parthiban, R, 2000, Lipid occurrence, distribution and degradation to flavor volatiles during tea processing, *Food Chemistry*, 68: 7 – 13.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2006, Handbook of Enology Vol. 1 – Microbiology of Wine and Vinifications 2ª Edição, John Wiley & Sons, Ltd.
- Rosa, P., 2004, O chá, João Azevedo Editor.
- Saberi, H., Tea: A Global History, Reaktion Books Ltd., 2010, cap. 1
- Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I., Frébertová, J., 2014, Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications, *Biotechnology Advances*, páginas 1 – 12.
- Scanes, K.T., Hohmann, S., Prior, B.A., 1998, Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 19: 17 – 24.
- Sengun, I. Y., Karabiyikli, S., 2011, Importance of acetic acid bacteria in food industry, *Food Control*, vol. 22, páginas 647 – 656
- Senthil Kumar, R. S., 2004, Studies on improving quality of South Indian black teas. Final technical reportsubmitted to Tea Board, Kolkata, India, pp. 1 – 71.
- Shen, C.–L., Yeh, J. K., Cao, J. J., Wang, J.–S., 2009, Green Tea and bone metabolism, *Nutrition Research*, 29: 437 – 456.
- Sievers, M., Teuber, M., 1995, The microbiology and taxonomy of *Acetobacter europaeus* in commercial vinegar production, *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*.

Silva, L. M., Capitão, C. M., Veiga, I. A., Noéme, C., 2009, Inovação e Criação de Novos Negócios, editado pela Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 1ª ed.

Stambuk, B. U., Batista, A. S., de Araújo, P. S., 2000, Kinetics of Active Sucrose Transport in *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Bioscience And Bioengineering, 89(2): 212 – 214.

van Dijken, J., Sheffers, W., 1986, Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. FEMS Microbiology Reviews, 32: 199 – 224.

Wan, X., Li, D., Zhang, Z., in Tea and Tea Products Chemistry and Health-Promoting Properties, Ho, C., Lin, J., Shahidi, F. (Editores), CRC Press, 2009, cap. 1, pp. 1 - 8

Zamora, F., 2009, Wine Chemistry and Biochemistry, Springer Science + Business Media, LLC, cap. 1, pp. 3 – 11.

Anexos

9

Anexo 1

Tempos de retenção - HPLC

Os seguintes tempos de retenção são relativos à utilização da coluna Shodex SUGAR SH1011, para detecção de glúcidos e ácidos orgânicos, para uma concentração de eluente de 5mM, com um fluxo de 0,6mL/min e a uma temperatura de coluna de 60°C.

| Composto | Tempo de retenção(min) |
|----------------------|-------------------------------|
| Glucose | 11,32 |
| D (-)-frutose | 12,01 |
| Ácidoacético | 16,90 |
| Etanol | 23,43 |

Anexo 2

Curvas de calibração

As curvas de calibração apresentadas foram baseadas na razão entre a área do pico correspondente a um composto com concentração e tempo de retenção constantes (o padrão) e a área do pico correspondente a cada um dos compostos referidos.

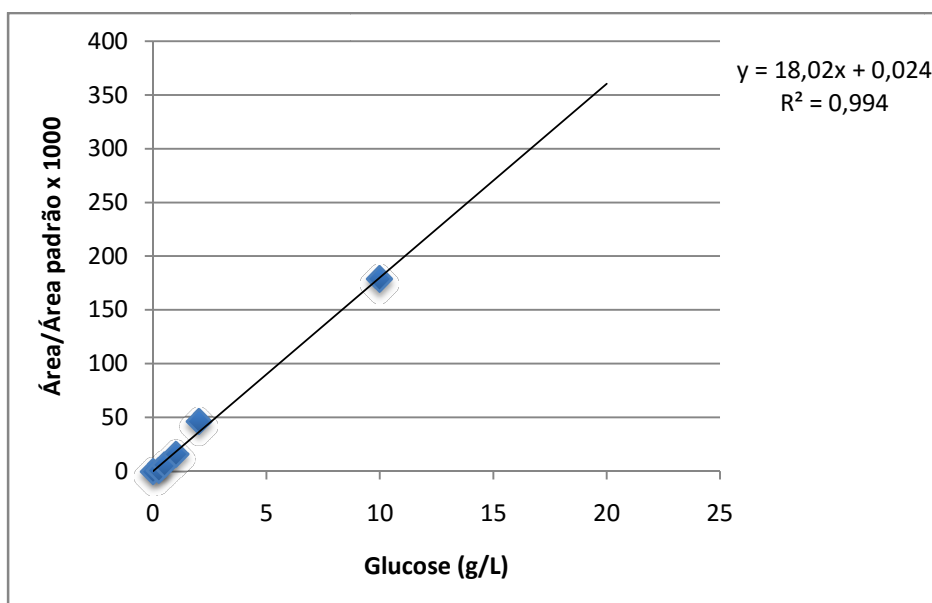


Figura 32 - Curva de calibração para a glicose

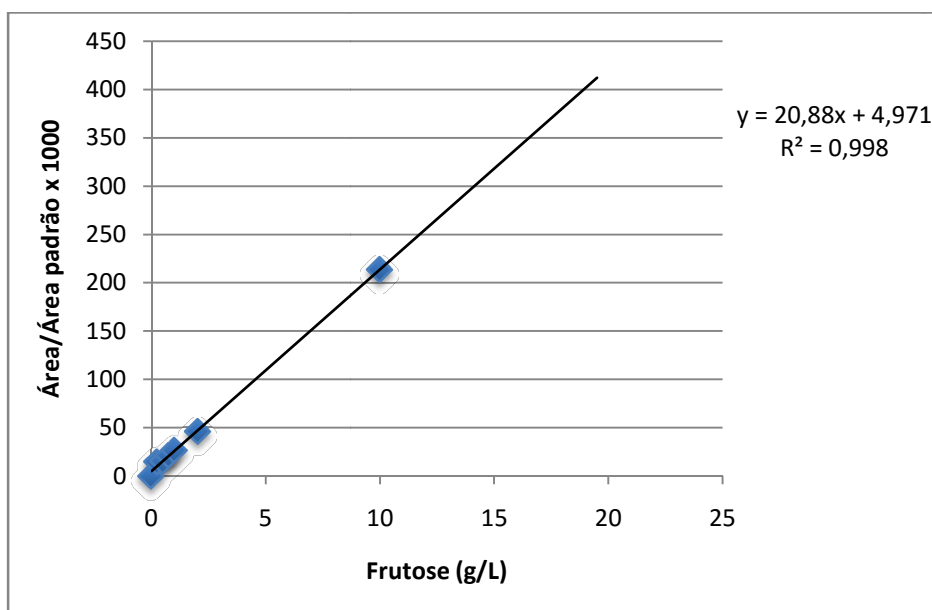


Figura 33 - Curva de calibração para a frutose

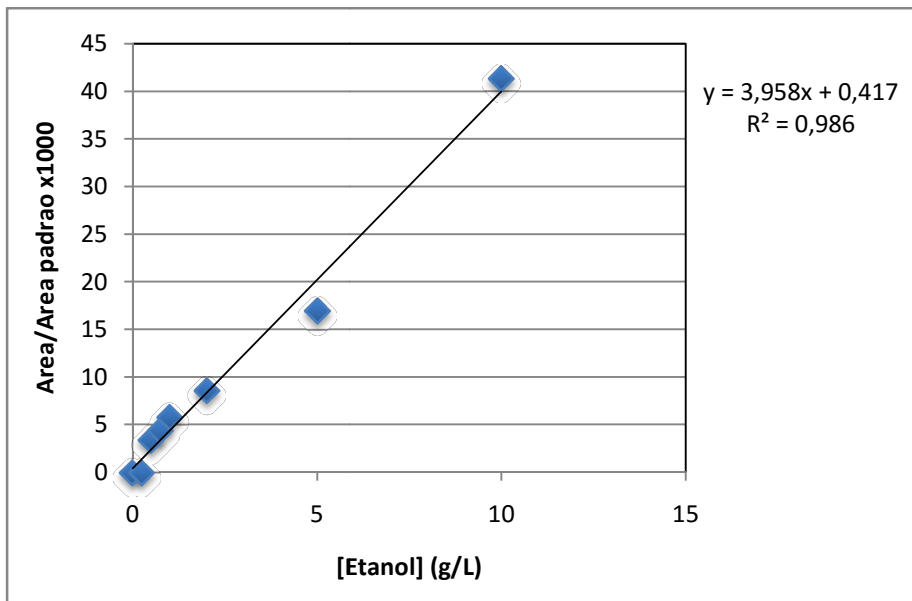


Figura 34 - Curva de calibração para o etanol

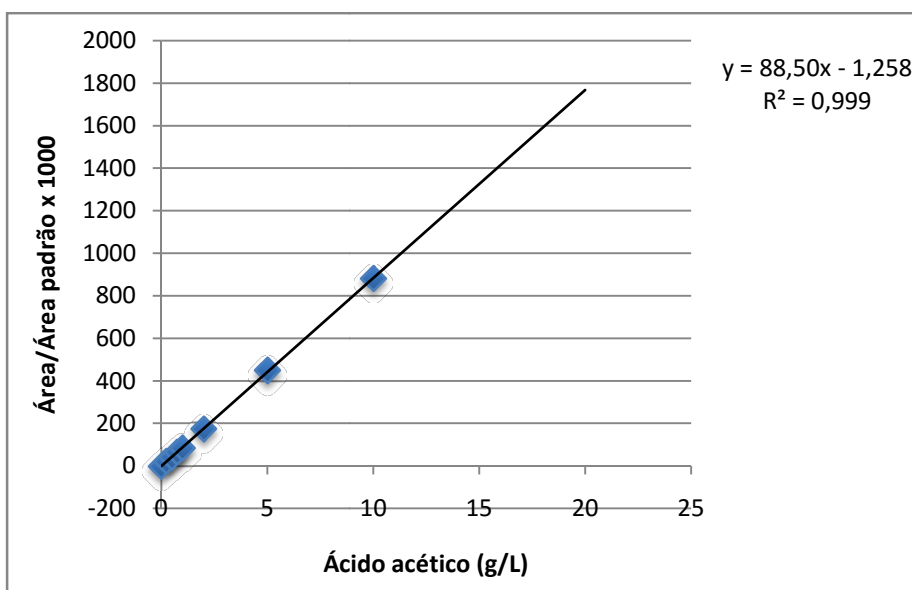


Figura 35 - Curva de calibração para o ácido acético

Anexo 3

>2bac5+AC3 908

agggggggggggggcgggcgccgcgccgagggcacaaggcgaccggaaatgctgttgctg
cagcactaaaggcggaaccctctaacttagcactcatcgtttacggcgtggactacca
gggtatctaatacctggttgctccccacgctttcgcgcctcagcgtcagttacagaccaaga
gtcgccttcgccactgggtgttccctccacatctctacgcatttcaccgctacacgtggaattc
cactcttctctctgcaactcaagtccccagtttccaatgaccctccacggttgagccgtgg
gctttcacatcagacttaaaggaccgctgcgcgctttacgccaataattccggacaac
gcttgccacctacgtattaccgcggtgctggcacgtagttagccgtggctttctggttagg
taccgtcaaggatagaagcagttactcttgtacttgttcttccctaacaacagagttttacga
tccgaaaaccttcatcactcacgcggcgttgctccgtcagactttcgtccattgcggaagat
tccctactgctgctcccgtaggagtctgggcccgtgtctcagtcaccagtgtggccgatcacc
ctctcaggtcggctacgcatcgtcgccttggtagccgttacctaccaactagctaattgcg
ccgcgggcccactctgtaagtgcagcgtaaaccgtctttcagcttttccctcatgagaggaaa
aggattatccggtattagctccggtttcccgaagttatcccagctttacaggcaggttgccc
acgtgttactcaccgctccgcccgtaaactttaaaagcaagcttttaagtcgctcgacttg
catgtgttaacaggccccccccagcaaaaaaaaaatcccct

>2bac5+AC1 912

aagggggggggggcgcggggggaaacactggtaaacccgatggtagtaaggtaagggaac
ctgcctgtaagactgggataacttcgggaaaccggagctaataccggataatccttttctc
tcatgaggaaaagctgaaagacggtttacgctgtcacttacagatgggcccgcggcgatta
gctagttggtaggtaacggctcaccaaggcagcagatgctgtagccgacctgagagggtagc
ggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtagggaatcttcc
gcaatggacgaaagtctgacggagcaacgcccgtgagtgatgaaggttttcggatcgtaaa
actctgttggtagggaagaacaagtacaagagtaactgcttgtaccttgacggtacctaacc
agaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggttaatacgtaggtaggcaagcgttgcc
ggaattattgggtagaaagcgcgcgagggcgtcctttaagtctgatgtgaaagcccacggc
tcaaccgtggagggtcattggaaaactggggacttgagtgacagaagagaagagtggaattcc
acgtgtagcggtagaaatgctgtagagatgtggaggaacaccagtgggcgaaggcagctcttgg
tctgtaactgacgctgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagt
ccacgcccgtaaacgatgagtgctaagtgttagagggtttccgccccttagtgctgcagcaaa
cgattaagcactccgcccgtgggagtagcggccgcaaggctgaaactcaaggaattgacggg
ggcccgcacaagcgggtggagcaatctggttaataaaaaattttt

>3bac8+AC1 928

aggggccccggggcgcgccgcaacccggggccagccggggaaaaagcggcagacgggtgag
taacacgtaggcaacctgcctgtaagactgggataactcgcggaacgcgagctaataccgg
ataatacttatcatctcctgatggtaagttgaaaggcggcttttgctgtcacttacagatgg
gcctgccccgcattagctagttggtagggtaacggctcaccaaggcagcagatgctgtagccga
cctgagagggtagatcgccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagc
agtagggaatcttccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgcccgtgagtgatgaagg
ttttcggatcgtaaaactctgttgcggggaagaacaagtatgatagtaactgatcgtacct
tgacggtacccgaccagaaagccacggctaactacgtgccagcagccggttaatacgtagg
tggaagcgttgccggaattattgggtagaaagcgtcgcagggcgttctttaagtctgat
gtgaaatcttgcggctcaaccgtaaacgtgcattggaaactggaggacttgagtgacagaaga
ggagagtggaattccacgtgtagcggtagaaatgctgtagagatgtggaggaacaccagtgggc
aaggcagctctctggtctgtaactgacgctgaggagcgaagcgtggggagcgaacaggatt
agataccctggtagtccacgcccgtaaacgatgagtgctaggtgttaggggtttccgcccct
tagtgctgaagttaacgcattaagcactccgcccgtgggagtagcggccgcaaggctgaaactc
aaaagaattgacggggaccgcacaagcggtagccattcgtgggttaataaaaaaggggg

>3bac8+AC3 1023

cggggcccggccgtggggaataatataaccgtcgcagacagagtcccagcagggggcaggcaa
atgcgtaacttcagcactaagggcgaaaccccctaacacctagcactcatcgtttacgg
cgtggactaccagggatcctaactcctgttcgctccccacgctttcgtcctcagcgtcagtt
acagaccagagagtcgcttcgccactgggtgttcctccacatctctacgcatttcaccgcta
cacgtggaattccactctcctcttctgcactcaagtccctccagtttccaatgcacgtttacg
gttgagccgcaagatttcacatcagacttaaagaaccgctgcgagcgttttacgccaata
attccggacaacgcttgccacctacgtattaccgcggtgctggcacgtagttagccgtggc
tttctggtcgggtaccgtcaaggtacgatcagttactatcatacttgttcttccccgacaac
agagttttacgatccgaaaaccttcatcactcacgcggttgcctcagactttcgtcc
attgcggaagattccctactgctgcctcccgtaggagtctgggcccgtgtctcagtcaccagtg
tggccgatcaccctctcaggtcggctacgcatcgtcgccttggtagccggttaccaccaa
ctagctaatagcgcccagggccatctgtaagtgcagcaaaagccgctttcaacttaccat
caggagatgataagattatccggtattagctcgcgtttccgaggttatcccagtttaca
ggcaggttgccctacgtgttactcaccgctccgctcgttccacgaacgtccctccgaaga
gttctgtccgcttcccgcgctcgacttgcatgtgtaagcaggcccccagcataaaaacca
aaaataaaaaaaagagacaccaatttaatacaccgataccacactcaccacaaaaatttg
acaaacaaaagatacacacacacatataatac

Figura 36 – Sequências obtidas para dois dos isolados de bactérias acéticas obtidos a partir de vinagre produzido com a mãe da kombucha (3bac5) e com a mãe do vinagre (3bac8)

Anexo 4

Análise Sensorial de vinagre de chá

Idade: _____ Sexo: _____

Profissão: _____

Por favor classifique a amostra apresentada, atribuindo uma pontuação de 1 (desgosto extremamente) a 5 (gosto extremamente) a cada um dos seguintes atributos, conforme a sua opinião.

Código da Amostra _____

Aspecto geral

| | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Cor

| | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Aroma

| | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Acidez/ Sabor acético

| | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Apreciação Global

| | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Observações: _____

Compraria este produto?

De certeza
não compraria

Provavelmente
não compraria

Talvez
comprasse

De certeza
compraria

Obrigada pela colaboração