

Desenvolvimento de bebidas fermentadas a partir de subprodutos de ananás dos Açores

Francisco Rocha Brum Ferreira Leite

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadoras: Professora Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista
Doutora Marisa Andreia Viegas Ventura Santos

Júri:

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Associado 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

Agradecimentos

O meu profundo agradecimento à Senhora Professora Doutora Catarina Prista e à Senhora Doutora Marisa Santos, pela disponibilidade incondicional, pelo apoio, pelo conhecimento e pela serenidade transmitida ao longo da elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Francisco Almeida, Mariana Machado e Sara Hourmat, agradeço o bom ambiente e os bons momentos. Foi um gosto partilhar esta etapa e este tempo convosco.

Agradeço às investigadoras Rafaela Santos, Sara Simões e Patrícia Branco, por toda a ajuda, simpatia e disponibilidade.

Aos meus amigos e família que, de uma forma ou de outra, me acompanharam e não me deixaram desanimar, obrigado.

Um muito obrigado à empresa Boa Fruta que, por facultar a possibilidade de estágio e pela confiança demonstrada, permitiu a minha colaboração neste projeto desafiante, inovador e que vai ao encontro da valorização de mais um produto que tem sido rejeitado como desperdício e que pode ser um acrescento ao futuro da ciência e do planeta.

Por fim, agradeço à minha mãe por suportar toda a minha formação académica, pelo apoio incondicional, pelo incentivo e pelos ensinamentos de vida que partilhou comigo.

A todos vós dedico este trabalho.

Resumo

Associado ao conceito de economia circular, como proposta para o aproveitamento do desperdício associado ao ananás DOP dos Açores, desenvolveram-se dois produtos fermentados inovadores: (i) uma bebida baseada no método de produção do *Tepache*, a partir da fermentação espontânea das cascas e partes fibrosas pela microbiota naturalmente presente, e (ii) um “Vinagre-Kombucha” de ananás, a partir da fermentação do mosto inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* e mãe de kombucha.

Para ambos os produtos, monitorizou-se a evolução das características físico-químicas e microbiológicas ao longo da fermentação com base em metodologias correntes, avaliando-se o efeito dos fatores de produção nas suas propriedades, eficiência tecnológica, fermentação e na aceitabilidade das bebidas. No *Tepache*, analisou-se o efeito da concentração de açúcar adicionado (5%, 10% e 15%(m/v)). No vinagre, utilizaram-se três métodos de produção, com culturas de arranque (*S.cerevisiae* e *backslopping* com uma “mãe de kombucha” não pasteurizada e acética) em fases diferentes da fermentação, e o efeito do arejamento forçado durante a fermentação.

Na produção de *Tepache* identificaram-se duas espécies dominantes de leveduras (*Hanseniaspora opuntiae* e *Meyerozyma carribbica*), presentes naturalmente nas cascas dos ananases. Os *Tepaches*, apresentaram valores de açúcares simples entre 4,3 e 15,5%(m/v) e teores de etanol superiores aos valores esperados (entre 4,5 e 5,3%(m/v)). Os *Tepaches* com 10 e 15% de açúcar adicionado, apresentaram características sensoriais bem aceites pelo consumidor, selecionando-se a bebida com 10%, dado ter revelado melhor eficiência na utilização de substrato e produção de metabolitos.

No caso do vinagre, apesar de nenhum apresentar os limites mínimos legais impostos para este produto, a inoculação inicial com *S.cerevisiae* e a utilização apenas de “Mãe de Kombucha” permitiram o consumo quase total dos açúcares, sendo o produto produzido com arejamento forçado e “Mãe de Kombucha” aquele que ficou mais próximo do desejado dado apresentar maior acidez (3,8% (g ácido acético/mL)).

Palavras-chave: Ananás DOP dos Açores, *Tepache*; Vinagre, Fermentação, subprodutos

Abstract

Associated with the concept of circular economy, as a proposal to make use of the waste associated with pineapple DOP from Azores, two innovative fermented products were developed: (i) a drink based on the Tepache production method, with the spontaneous fermentation of the skins and fibrous parts by the naturally present microbiota, and (ii) a pineapple “Kombucha Vinegar”, produced by must fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and mother of kombucha.

For both products, the evolution of the physicochemical and microbiological characteristics was monitored throughout the fermentation based on current methodologies, evaluating the effect of production factors on their properties, technological efficiency, fermentation and on the acceptability of the beverages. In Tepache, the effect of sugar concentration (5%, 10% and 15%(w/v)) was analyzed. For vinegar, three production methods were used, with starter cultures at different stages of fermentation (*S.cerevisiae* and backslopping with an unpasteurized, acetic “kombucha mother”). The effect of forced aeration during fermentation was also evaluated.

In Tepache production, two dominant yeasts species (*Hanseniaspora opuntiae* and *Meyerozyma caribbica*) were identified, naturally present in pineapple peels. The Tepaches, presented values of simple sugars between 4.3 and 15.5%(w/v) and ethanol contents higher than the expected (between 4.5 and 5.3%(w/v)). The Tepaches with 10 and 15% of added sugar showed sensory characteristics well accepted by the consumer. The drink with 10% added sugar was selected for its better efficiency in the use of substrate and production of metabolites.

In the case of vinegars, although none of them present the minimum legal limits imposed for this product, the initial inoculation with *S.cerevisiae* and the exclusive use “Mãe de Kombucha” allowed the almost total consumption of sugars, the product being produced with forced aeration. and “Mãe de Kombucha” the one that was closest to the desired one, as it had higher acidity (3.8% (g acetic acid/mL)).

Keywords: Azore’s DOP Pineapple, Tepache, Vinagar, fermentation, by-products

Índice	
Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas.....	ix
Índice de Abreviaturas e Acrónimos.....	x
1. Introdução e objetivos	1
1.1 Objetivos do trabalho	1
2. Enquadramento teórico	3
2.1 O ananás (<i>Ananas comosus</i> L.).....	3
2.1.1 Características do ananás.....	3
2.1.2 O Ananás DOP dos Açores.....	4
2.2 A empresa Boa Fruta.....	4
2.3 Desenvolvimento de novos produtos alimentares.....	5
2.3.1 Tendências alimentares.....	5
2.3.2 Economia circular	6
2.3.3 Alimentos e bebidas fermentados	6
2.4 O Tepache	7
2.4.1 Enquadramento histórico e cultural do <i>Tepache</i>	7
2.4.2 Processo de produção do <i>Tepache</i>	7
2.4.3 Microrganismos envolvidos na produção de <i>Tepache</i>	8
2.5 O vinagre	9
2.5.1 Enquadramento histórico e cultural do vinagre.....	9
2.5.2 Produção de vinagre	10
2.5.2.1 Processo de Orléans (método lento)	10
2.5.2.2 Processo Alemão	11
2.5.2.3 Produção Submersa	12
2.5.3 Processos metabólicos e microbiota envolvidos na produção de vinagre	
13	
3 Materiais e métodos.....	16
3.1 Preparação do Substrato	16
3.2 Desenvolvimento das bebidas fermentadas.....	16
3.2.1 Tepache.....	16
3.2.2 Vinagre de ananás.....	17
3.3 Caraterização química e nutricional dos Produtos.....	17

3.3.1	Determinação do pH	17
3.3.2	Determinação do Grau Brix	18
3.3.3	Determinação da acidez titulável	18
3.3.4	Determinação dos açúcares, etanol e ácidos orgânicos.....	18
3.3.5	Determinação dos compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante	19
3.4	Caraterização microbiológica: Determinação da viabilidade celular (UFC/mL) e células viáveis totais (hemocitómetro).....	20
3.4.1	Meios de cultura	20
3.4.2	Contagens de microrganismos	21
3.4.3	Extração de DNA.....	21
3.4.4	Amplificação de DNA.....	21
3.4.5	Quantificação do produto PCR.....	22
3.4.6	Sequenciação de DNA.....	22
3.5	Caraterização física dos Produtos.....	23
3.5.1	Ensaio Reológicos – Viscosidade	23
3.5.2	Colorimetria	23
3.6	Avaliação sensorial por um painel de provadores e de consumidores com base em inquéritos.	24
3.7	Tratamento estatístico	24
4	Resultados e discussão	25
A.	Tepache a partir de mosto de ananás DOP dos Açores.....	25
4.1	Obtenção da matéria-prima - rendimento	25
4.2	Evolução Microbiológica do Tepache.....	25
4.3	Evolução dos valores de pH e da acidez titulável ao longo do processo.....	29
4.4	Grau Brix.....	30
4.5	Evolução da concentração de açúcar nas diferentes formulações do Tepache com a metabolização dos açúcares livres e produção de álcool e ácidos.....	31
4.5.1	Evolução dos açúcares ao longo do tempo de fermentação	31
4.5.2	Evolução do álcool ao longo do tempo de fermentação	33
4.5.3	Evolução dos ácidos ao longo do tempo de fermentação	34
4.6	Evolução do teor em compostos com propriedades antioxidantes.....	35
4.7	Evolução de parâmetros relacionados com aspetos sensoriais dos Tepaches produzidos	37
4.7.1	Viscosidade.....	37
4.7.2	Cor do Tepache.....	39
4.8	Avaliação sensorial.....	41
B.	Vinagre a partir de mosto de ananás DOP dos Açores.....	43

4.9	Evolução do pH e da acidez	44
4.10	Evolução do °Brix.....	45
4.11	Evolução da microbiota ao longo do processo de produção de vinagre	47
4.12	Evolução da concentração de açúcar nos diferentes métodos de produção do vinagre com a metabolização dos açúcares livres, produção de álcool e ácidos	47
	4.12.1 Utilização dos açúcares.....	47
	4.12.2 Produção de álcool e ácido acético	48
4.13	Influência no arejamento forçado na produção do vinagre.....	48
5	Conclusões e perspectivas futuras	51
6	Bibliografia.....	54
7	Anexos	58

Índice de Figuras

Figura 1 - Ananás DOP dos Açores (esquerda) vs Ananás comum (direita)	4
Figura 2 - Corte transversal de uma barrica vinagreira no processo lento (Fonte: Cruz, 2012)	11
Figura 3 - Sistema utilizado no processo alemão de produção de vinagre (Fonte: Cruz, 2012)	12
Figura 4 - Fluxograma dos processos metabólico envolvidos na produção de vinagre (Fonte: Veloso, 2013).....	13
Figura 5 - Aspeto visual das colónias isoladas da Levedura 1 após 24h de inoculação em meio de YPD e respetiva imagem obtida por microscopia (objetiva 100x).....	26
Figura 6 - Aspeto visual das colónias isoladas da Levedura 2 após 24h de inoculação em meio de YPD e respetiva imagem obtida por microscopia (objetiva 100x).....	26
Figura 7 - Evolução do número de células viáveis cultiváveis de leveduras ao longo do processo de produção do Tepache 5%.....	27
Figura 8 - Evolução do número de células viáveis cultiváveis de leveduras ao longo do processo de produção do Tepache 10%.....	28
Figura 9 - Evolução do número de células viáveis cultiváveis de leveduras ao longo do processo de produção do Tepache 15%.....	28
Figura 10 - Evolução do número de células viáveis cultiváveis de bactérias ácido lácticas ao longo do processo de produção das diferentes formulações do Tepache	29
Figura 11 - Evolução do pH e acidez total no Tepache ao longo do tempo de fermentação	30
Figura 12- Evolução do °Brix ao longo do tempo de fermentação de cada formulação de Tepache ...	31
Figura 13 - Evolução da concentração de açúcares ao longo do processo fermentativo do Tepache 5% *letras diferentes indicam diferença significativa entre valores (p<0.05).....	32
Figura 14 - Evolução da concentração de açúcares ao longo do processo fermentativo do Tepache 10% *letras diferentes indicam diferença significativa entre valores (p<0.05).....	32
Figura 15 - Evolução da concentração de açúcares ao longo do processo fermentativo do Tepache 15% *letras diferentes indicam diferença significativa entre valores (p<0.05).....	33
Figura 16 - Evolução do teor alcoólico ao longo da fermentação do Tepache	34
Figura 17 - Evolução do ácido acético ao longo da fermentação do Tepache.....	35
Figura 18 - Influência do tempo de fermentação com a evolução dos fenóis totais presentes na bebida *letras ou símbolos diferentes indicam diferença significativa entre valores (p<0.05)	36
Figura 19 - Influência do tempo de fermentação com a evolução da atividade antioxidante obtida pelo método DPPH *letras ou símbolos diferentes indicam diferença significativa entre valores (p<0.05)	36
Figura 20 - A atividade antioxidante ao longo do processo de produção de Tepache, obtida pelo método FRAP *letras ou símbolos diferentes indicam diferença significativa entre valores (p<0.05)	37
Figura 21 - Evolução da viscosidade com o aumento da velocidade de deformação no Tepache 5% .	38
Figura 22 - Evolução da viscosidade com o aumento da velocidade de deformação no Tepache 10% .	38
Figura 23 - Evolução da viscosidade com o aumento da velocidade de deformação no Tepache 15% .	38
Figura 24 – Parâmetro L* e coordenadas cromáticas de cada formulação de Tepache *letras diferentes indicam diferença significativa entre valores (p<0.05).....	40
Figura 25 - Tepache 5% (A), Tepache 10% (B) e Tepache 15% (C)	40
Figura 26 - Sexo dos provadores	41
Figura 27 - Idade dos provadores.....	41
Figura 28 - Intenção de compra por parte dos provadores para cada formulação de Tepache *letras diferentes indicam a existencia de diferença significativa.....	42
Figura 29 – Médias dos resultados obtidos para a análise sensorial do Tepache	43
Figura 30 - Evolução do pH e acidez total no Vinagre S ao longo da sua produção	44
Figura 31 - Evolução do pH e acidez total no Vinagre K ao longo da sua produção	45
Figura 32 - Evolução do pH e acidez total no Vinagre KS ao longo da sua produção	45

Figura 33 - Evolução do °Brix ao longo do tempo de fermentação em cada método de produção de vinagre.....	46
Figura 34 - ANOVA do °Brix no vinagre final de cada método de produção *letras diferentes indicam a existência de diferença significativa ($p < 0.05$)	46
Figura 35 - Consumo de substrato ao longo do tempo de produção de cada vinagre	47
Figura 36 - Evolução da concentração de ácido acético e de etanol ao longo da produção dos vinagres	48
Figura 37 - Influência na evolução físico-química do vinagre ao aplicar o arejamento forçado (SA) ...	49
Figura 38 - Influência na evolução físico-química do vinagre ao aplicar o arejamento forçado (KA).	49
Figura 39 - Evolução do °Brix ao longo do tempo de fermentação	50
Figura 40 - Reta de calibração utilizadas para a determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH	58
Figura 41 - Reta de calibração utilizadas para a determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP	58
Figura 42 - Reta de calibração utilizadas para a determinação da concentração de compostos fenólicos totais	59
Figura 43 - Reta de calibração para a concentração de ácido acético	60
Figura 44 - Reta de calibração para a concentração de ácido láctico	60
Figura 45 - Reta de calibração para a concentração de glucose	61
Figura 46 - Reta de calibração para a concentração de Frutose	61
Figura 47 - Reta de calibração para a concentração de Etanol	61
Figura 48 – Bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose do ADN amplificado das leveduras isoladas. Nos extremos encontra-se o padrão de peso molecular DNA Ladder I (NZYTech).....	62

Índice de Tabelas

Tabela 1- Análise qualitativa a 100g de polpa de Ananás DOP dos Açores Fonte: IAMA.....	3
Tabela 2 - Principais características definidas pela legislação portuguesa relativa ao vinagre produzido em Portugal	10
Tabela 3 - Sequências dos primers ITS1 e ITS4	21
Tabela 4 - Mistura reacional para PCR por amostra	22
Tabela 5 - Programa de PCR utilizado	22
Tabela 6 – Valores médios percentuais (p/p) dos três tipos de substrato (casca, fibra e sumo) na composição do ananás dos Açores (média \pm dp, n=4).....	25
Tabela 7 – Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* do Tepache 5% ao longo do processo	39
Tabela 8 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* do Tepache 10% ao longo do processo	39
Tabela 9 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* do Tepache 15% ao longo do processo	39
Tabela 10 - Variação dos parâmetros entre o início e final da fermentação do Tepache	41
Tabela 11 - Classificações médias de cada formulação de Tepache da avaliação sensorial.....	42
Tabela 12 - Intenção de comprar para cada formulação de Tepache	42
Tabela 13 - Valores resumo das formulações da bebida Tepache	51
Tabela 14 - Valores resumo dos vinagres acabados	53

Índice de Abreviaturas e Acrónimos

ADH - álcool desidrogenase

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ALDH – aldeído-desidrogenase

ATP – adenosina trifosfato

BAA – Bactérias ácido-acéticas

BAL – Bactérias ácido-láticas

DOP – Designação de origem protegida

GYC – Glucose Yeast extract Calcium carbonate

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

SCOBY – Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast

Tep5% - *Tepache* com 5% de concentração inicial de açúcar (p/v)

Tep10% - *Tepache* com 10% de concentração inicial de açúcar (p/v)

Tep15% - *Tepache* com 15% de concentração inicial de açúcar (p/v)

Vinagre S – mosto de ananás inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* e com *Scoby* de *kombucha* às 48h de fermentação

Vinagre K – mosto de ananás inoculado apenas com *scoby* de *kombucha*

Vinagre KS – mosto de ananás inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* e *scoby* de *kombucha* em simultâneo

YPD – Yeast extract Petone Dextrose

1. Introdução e objetivos

O principal destino do Ananás DOP dos Açores é a venda direta do fruto, quer para o mercado nacional quer para o mercado internacional.

No caso dos frutos de menor calibre ou que apresentem algum defeito, o fruto é aproveitado para a produção de doces, licores, gelados entre outros produtos, atualmente produzidos por outras empresas.

Existe um desperdício associado ao ananás que é constituído fundamentalmente pela zona central do fruto, cascas e coroa (Chu et al., 2020). Aproximadamente 25% do seu peso é desperdiçado na indústria (Mohd Ali et al., 2020). Em termos de aproveitamento, estes são considerados pouco atrativos para alimentação animal devido ao elevado teor de fibra das cascas, hidratos de carbono muito solúveis e baixo teor em proteínas. No entanto, estes subprodutos contém açúcares e ácidos orgânicos que podem ser utilizados como substrato para a produção de outros produtos (Chu et al., 2020).

O presente projeto resulta da ideia proposta pela empresa “Boa Fruta”, produtora e comercializadora de ananás dos Açores, com o intuito de reduzir o desperdício associado a este fruto, com média anual de 30 toneladas de fruto inteiro desperdiçado, algo que tem sido um tema de muita atenção por parte da empresa.

Com base na necessidade de gestão de subprodutos por parte desta indústria de processamento de ananás dos Açores, o presente trabalho teve como objetivo testar uma solução de aproveitamento total deste fruto (excetuando a coroa). A solução proposta passou pela utilização do ananás como principal substrato na produção de dois tipos de alimentos fermentados: uma bebida designada de “*Tepache*” e um novo vinagre.

1.1 Objetivos do trabalho

O trabalho experimental desenvolvido teve como objetivo a produção de dois produtos líquidos fermentados a partir dos subprodutos resultantes da cadeia de produção e comercialização do Ananás dos Açores, nomeadamente as cascas, parte central do fruto resultantes da produção de outros produtos mais processados e também frutos inteiros que são rejeitados devido ao seu calibre e formas irregulares que não obedecem ao padrão para colocação no mercado. Para obter estes produtos, foram utilizados o processo de produção do *Tepache*, com a fermentação das cascas em água com açúcar mascavado, e do vinagre, em que após obtenção do mosto do ananás, este foi sujeito a duas fermentações consecutivas (Alcoólica e Acética).

Desenvolvimento de bebidas fermentadas a partir de subprodutos de ananás dos Açores

Mais especificamente, no caso do *Tepache* utilizou-se a microbiota presente na casca e mosto de ananás, e pretendeu-se avaliar a evolução da bebida produzida a partir de três concentrações iniciais de açúcar (selecionadas com base na informação de (Corona-González et al., 2013)), tendo-se utilizado 5%, 10% e 15%(p/v). As restantes variáveis como a temperatura (25°C) e tempo de fermentação (72h de fermentação aeróbica e 48h em anaerobiose) mantiveram-se constantes. Ao longo do processo analisou-se:

- a evolução da microbiota por plaqueamento à superfície em meios seletivos e caracterização macromorfológica e identificação molecular das espécies dominantes;
- a evolução dos parâmetros físicos;
- a evolução dos parâmetros químicos através da determinação do pH e °Brix, e da acidez total;
- avaliou-se ainda em termos sensoriais o impacto da formulação no produto final.

Em relação ao vinagre, foi feita a fermentação do mosto do ananás em condições aeróbicas com diferentes métodos de inoculação, com o objetivo de avaliar ambos e destacar o que apresentasse maior eficiência. Nesta bebida foram usadas culturas *starter* de *Saccharomyces cerevisiae* e “mães de kombucha” para induzir a fermentação, tendo-se seguido o processo e caracterizado o produto final através da recolha de amostras e realização de análises similares às descritas acima.

2. Enquadramento teórico

2.1 O ananás (*Ananas comosus* L.)

2.1.1 Características do ananás

O ananás é o fruto da planta *Ananas comosus* L..Este fruto apresenta elevados teores de água, fibras, açúcares, ácidos orgânicos, vitaminas, tal como vitamina C, Niacina (B3), Tiamina (B1) e minerais, como por exemplo o magnésio e manganês (Mohd Ali et al., 2020). Na Tabela 1, é apresentada a constituição nutricional oficial do Ananás dos Açores DOP. É também constituinte do ananás uma enzima proteolítica, a bromelaína, que auxilia nos processos digestivos. Esta enzima tem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas e de cardioproteção (Mohd Ali et al., 2020).

Tabela 1- Análise qualitativa a 100g de polpa de Ananás DOP dos Açores Fonte: IAMA

Ananás DOP dos Açores	
Humidade	85 %
Resíduo seco total	14 %
solúvel	13,2 %
insolúvel	0,8 %
Açúcares totais	10 %
redutores	4,5 %
Sacarose	5,5 %
pH	3,5
Acidez total (exp. Acido cítrico monohidratado)	1 %
Acidez total (exep. Acido málico)	0,9 %
Acidez volátil (exp. Acido acético)	0,013 %
Cinza total	0,33 %
Celulose	0,67 %
Proteína	0,45 %
Vitamina C	17 mg/100g
Vitamina B1	0,08 mg/100g
Vitamina B2	0,04 mg/100g

2.1.2 O Ananás DOP dos Açores

Nos Açores, em São Miguel, é cultivada em estufa a planta *Ananas comosus* L. Merrill da família das *Bromeliaceas* e variedade Cayene “folhas lisas”. As técnicas de cultivo tradicionais desta cultura fazem com que o fruto final se diferencie pelo seu aspeto físico e pelas suas características organoléticas. Em termos de aspeto (Figura 1), tem uma coroa simples, de dimensão entre 1/3 e 1/4 do comprimento do fruto, o fruto tem uma forma cilíndrica, ligeiramente afusado, com casca laranja forte e polpa amarela. Em plena maturação a polpa do ananás apresenta uma coloração amarela, translúcida, com um sabor característico agri-doce (IAMA,1994). As principais diferenças entre o ananás DOP dos Açores e o Ananás comum (ou abacaxi), fisicamente está no tamanho da coroa do fruto e na forma, sendo o abacaxi mais alongado e apresentando um sabor mais doce que o primeiro.



Figura 1 - Ananás DOP dos Açores (esquerda) vs Ananás comum (direita)

2.2 A empresa Boa Fruta

Fundada em 2016, esta empresa continua o legado da família que desde 1930 se dedicou à promoção, produção e comercialização de fruta dos Açores, com especial ênfase no Ananás dos Açores. Esta empresa familiar, sediada na Fajã de Baixo, em Ponta Delgada (São Miguel), é uma das principais produtoras de Ananás dos Açores da região e encontra-se já na quarta geração de produtores.

Para além dos projetos de investigação e desenvolvimento dos seus produtos alimentares, tal como os chocolates de ananás, licores, compotas, gelados entre outros, também procuram o desenvolvimento de outros projetos não alimentares com uma visão do aproveitamento total do ananás, como por exemplo o desenvolvidos eco compósito com a fibra da folha de ananás que vai permitir ter um material que pode ser trabalhado para a produção de peças de mobiliário interiores e exteriores bem como peças decorativas.

Esta empresa tem os seus produtos certificados com o selo “Marca Açores”, uma certificação local com o propósito da valorização da produção regional que lhes permite o

reconhecimento em mercados externos e participação em eventos exclusivos. Este certificado exige, segundo a Resolução do Conselho do Governo nº 161/2015, de 1 de abril, que pelo menos 80% dos seus custos de produção sejam em fatores de origem regional, como por exemplo ingredientes ou serviços externos. O que no caso dos frutos vendidos a fresco é 100%.

2.3 Desenvolvimento de novos produtos alimentares

2.3.1 Tendências alimentares

A nível europeu, é na indústria alimentar que encontramos o maior setor de produção a nível europeu, constituído maioritariamente por pequenas e médias empresas, e onde são criados mais postos de trabalho (Food Drink Europe, 2019).

Com o passar do tempo, os hábitos de consumo mudaram e com isso a indústria teve que se adaptar às novas tendências. Nos últimos anos, os consumidores começaram a fazer a interligação entre alimentação e saúde e, conseqüentemente, a preocuparem-se com aquilo que incluem na sua alimentação (Innova Market Insights, 2021). Para além disso o consumidor tem vindo de forma crescente a ter uma preocupação com o impacto ecológico associada às suas escolhas alimentares, estando os consumidores mais informados e mais criteriosos acerca daquilo que lhes é proposto por parte da indústria (Innova Market Insights, 2021). Com vista a responder às novas tendências de consumo, foi necessária uma adaptação por parte da indústria, implicando o desenvolvimento de novos produtos e conceitos alimentares que consigam dar a resposta a esta procura (Granato et al., 2010). Dentro destes produtos, os alimentos e bebidas com propriedades funcionais constituem produtos de eleição. Com a realidade pandémica atual, os alimentos funcionais ganharam um destaque ainda maior, pois o consumidor procura melhorar a sua imunidade através da sua alimentação (Mintel, 2021).

Dadas as propriedades benéficas para a saúde do consumidor, os produtos hortofrutícolas têm tido um aumento na sua procura. Para além do atraso no envelhecimento, também previnem o aparecimento de doenças degenerativas mas em contrapartida, estes produtos apresentam um elevado teor de açúcares solúveis, facilmente assimiláveis, o que pode representar um problema para alguns grupos de consumidores (Maria & Silvério, 2014).

Como resposta à procura das novas tendências, os alimentos fermentados podem vir a enquadrar perfeitamente neste novo contexto de alimentação, conseguindo através da fermentação de hortofrutícolas reduzir o teor em açúcares, aumentar a biodisponibilidade e digestibilidade de nutrientes, desenvolvimento de propriedades probióticas do alimento e

ainda apresentar um produto com reduzida pegada ambiental, pois é possível o aproveitamento de alimentos impróprios para venda mas que sirvam de matéria-prima, como por exemplo ananases e subprodutos do mesmo, para a produção destes alimentos, como o vinagre ou *Tepache* (Bortolini et al., 2001; Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020a).

2.3.2 Economia circular

Prevê-se que, em 2050, a população mundial terá atingido valores na ordem dos 9,7 bilhões de habitantes o que levará à necessidade de um aumento de 50% da produção global de alimentos (Food Drink Europe, 2019).

No Continente Europeu, são desperdiçadas 88 milhões de toneladas de alimentos, o que equivale a 20% da produção de alimentos e a uma perda de 143 bilhões de euros (Food Drink Europe, 2019). No atual modelo económico e industrial, os recursos usados na produção são perdidos após a sua utilização no qual resultam perdas para as empresas (Upadhyay et al., 2021). Na fase de produção e processamento de alimentos encontramos três quartos do total da emissão dos gases de efeito estufa associados à cadeia de produção dos alimentos (Food Drink Europe, 2019). Assim sendo, torna-se importante a transformação destes subprodutos, utilizando os processos tecnológicos corretos, conseguindo assim reduzir a poluição e impacto associado à sua ocupação e depósito em aterros, reduzir em quantidade o desperdício anual e ao mesmo tempo criar um produto de valor acrescentado (Aruna, 2019).

Dentro do conceito de economia circular aplicado à produção de ananás será necessário tirar partido do valor gerado devido à riqueza nutricional, enzimática e microbiológica deste fruto, reduzindo os desperdícios associados e acrescentando valor a resíduos que habitualmente não são utilizados. Ao longo da produção de ananás e dos produtos seus derivados, são produzidas uma enorme quantidade de subprodutos que criam o desafio de os tratar e de acrescentar-lhes valor de modo a reduzir o impacto associado em termos ambientais, sociais e económicos. Deste desperdício pode obter-se adubo através da compostagem e devolver ao solo o que a cultura lhe tirou, produzir biogás, bio hidrogénio, bebidas fermentadas entre outras alternativas (Chu et al., 2020; Zziwa et al., 2021).

2.3.3 Alimentos e bebidas fermentados

O processo de fermentação é um mecanismo de obtenção de energia por parte de microrganismos a partir de fontes de carbono, em que os componentes edíveis e não edíveis do alimento passam por processos químicos e enzimáticos que produzem certos

metabólitos, resultantes da quebra de ligações entre moléculas complexas, convertendo em moléculas mais simples, obtendo como resultado, um produto com melhoria nutricional, aumentando a digestibilidade e biodisponibilidade dos nutrientes bem como a sua atividade antioxidante; em termos sensoriais, este processo confere novos aromas e texturas ao alimento bem como o desenvolvimento do sabor umami, característico deste tipo de alimentos; com a fermentação também obtemos alimentos mais seguros, ao criar as condições seletivas favoráveis à microbiota pretendida, condicionamos o desenvolvimento de patogénicos, controlando a população existente bem como a degradação de toxinas e redução dos anti nutrientes, como por exemplo o caso das leguminosas (Galimberti et al., 2021; Kusznierevicz et al., 2008; Licandro et al., 2020; Xiang et al., 2019).

Os alimentos fermentados são relatados deste 13000 a.C. quando ainda eram produzidos para aumentar a validade e armazenar frutas e vegetais nas temperaturas ambientes das suas diferentes regiões de origem, promovendo a estabilidade microbiológica dos mesmos (Galimberti et al., 2021). Com a fermentação conseguimos reduzir o pH, aumentar a pressão osmótica e produzir substâncias com efeito bactericida (Simões et al., 2021).

2.4 O Tepache

2.4.1 Enquadramento histórico e cultural do Tepache

O *Tepache* é uma bebida fermentada refrescante, de origem pré-hispânica (Almeida, 2005). Originalmente esta bebida era feita com grão milho, mas também existem as versões com frutas variadas e atualmente ainda é muito consumida. Na região central do México, esta bebida é produzida a partir de principalmente ananás e outras frutas, como maçã e laranja, fermentadas em água adoçada com açúcar mascavado. Nesta região, as fermentações são preparadas em recipientes tipo barril de madeira chamado “tepacheras” (Almeida, 2005).

2.4.2 Processo de produção do Tepache

Tradicionalmente, para a produção de Tepache são colocadas cascas do ananás com açúcar pouco processado (localmente denominado de “piloncillo”) em água dentro das barricas e é deixada ocorrer a fermentação espontânea, também podem ser adicionadas outras frutas ou sumos das mesmas e especiarias, como por exemplo a pimenta. O tempo de fermentação varia entre 1 e 5 dias conforme o resultado que se deseja e com as condições externas em que são produzidas a bebida (Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020a) sendo necessário ter em atenção que ao prolongar este tempo a bebida pode desenvolver sabores mais avinagrados indesejáveis resultante do ácido acético produzido.

Neste processo, as fermentações são realizadas maioritariamente por leveduras e BAL que apresentam grande variedade consoante a origem do fruto (Moreno Terrazas Casildo, 2005; Robledo-Márquez et al., 2021).

Outro método tradicional, é a utilização de inóculos que se designam por “tibicos”, que são macro-moléculas que resultam da simbiose entre as leveduras e bactérias formando uns grãos parecidos aos do kefir de água.

Num método mais industrial, os microrganismos predominantes são do género *Saccharomyces* no caso das leveduras e a espécie *Lactiplanctibacillus pentosus* (anteriormente *Lactobacillus pentosus*) como espécie predominante de BAL. Neste método, ocorre a inoculação da solução com estas estirpes selecionadas afim de conseguir controlar e padronizar a qualidade do produto, conseguindo atingir uma maior escala com um produto regular (Robledo-Márquez et al., 2021).

2.4.3 Microrganismos envolvidos na produção de *Tepache*

Os dois grandes grupos de microrganismos envolvidos na produção do *Tepache* são as leveduras e as bactérias ácido lácticas (BAL) (Romero-luna et al., 2017), em alguns trabalhos, as leveduras encontradas e que dominam esta fermentação são *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera africana* e *Candida intermedia* (Almeida, 2005). No entanto, são encontrados noutros trabalhos a identificação de outras leveduras, que estão naturalmente presentes nas cascas do ananás, variando conforme a origem das mesmas e concentração de açúcar usada na produção da bebida, tal como *Candida apícola*, *Cryptococcus skinneri*, *Hanseniaspora* sp. e *Saccharomyces* sp. (Corona-González et al., 2013) e também bactérias acéticas como *Gluconobacter* spp. e *Acetobacter* spp. (Robledo-Márquez et al., 2021). No *Tepache* comercial, foi identificada a predominância de leveduras do género *Saccharomyces*, resultando da inoculação da bebida com culturas *starter*, algo normal na industrialização dos alimentos fermentados com a finalidade de padronizar o produto (Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020a).

Como BAL, temos referências à presença de *Lactiplanctibacillus* (anteriormente *Lactobacillus*), tal como o *Lactiplanctibacillus plantarum* (Romero-luna et al., 2017).

O resultado da simbiose entre as leveduras e as BAL, por vezes, são formados grãos, idênticos aos do kefir de água, com formas irregulares de cor amarelada e transparente, que posteriormente pode ser usado como inóculo para fermentações futuras (Romero-luna et al., 2017).

Na produção do *Tepache* estão envolvidas fermentações lácticas, alcoólicas e acetificação, sendo estas afetadas por fatores externos, como a temperatura e humidade, e

internos, como o pH e concentração de açúcares, durante a sua produção (Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020a).

Em termos de fatores externos, quanto maiores os tempos de fermentação, mais açúcares livres são consumidos, o que por sua vez eleva a concentração dos produtos resultantes da fermentação, o que influencia diretamente a bebida final, intervindo no nível de aceitação por parte do consumidor.

Tendo em conta a temperatura, vamos estar a influenciar a atividade das leveduras, sendo que em caso de se utilizar temperaturas elevadas vamos provocar a morte das leveduras e correr o risco de contaminações por patogénicos termófilos, por outro lado, com temperaturas demasiado baixas vamos abrandar a atividade fisiológica das leveduras.

Com o pH podemos também influenciarmos tanto o crescimento como o metabolismo dos microrganismos presentes na solução. Alguns estudos indicam que o crescimento das bactérias acéticas ao longo da fermentação está correlacionado com o pH inicial do meio. Quanto maior o nosso pH inicial maior será a nossa população de bactérias acéticas no final da fermentação, o que serve de indicador de que possa haver crescimento durante a fermentação alcoólica. (Corona-González et al., 2013)

Os microrganismos envolvidos na fermentação conferem à bebida um efeito bactericida contra as bactérias patogénicas, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* (Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020a).

2.5 O vinagre

2.5.1 Enquadramento histórico e cultural do vinagre

É um produto conhecido há cerca de 8000 anos a.C., com referências do uso como condimento na alimentação, devido às propriedades benéficas ao organismo humano, e também sendo utilizado como bebida refrescante, diluído na água, e medicamento (Terra & Leite, 2017).

O **Decreto-Lei n.º 174/2007 de 08 de Maio**, estabelece as normas a que deve obedecer o fabrico e distribuição do vinagre comercializado em Portugal. É neste decreto que se define as diferentes denominações dos vinagres bem como as matérias-primas e métodos a utilizar para cada um. Para o produto deste trabalho, é dada a designação de vinagre de fruta, por resultar do processo biológico de fermentação alcoólica e acética do sumo de fruta, neste caso o ananás, diferenciando-se da designação de vinagre de vinho, o mais comum, pelo facto do substrato que é submetido à fermentação deste último ser o vinho que já teve a sua fermentação alcoólica, sendo submetido apenas à acética.

Na Tabela 2, estão apresentadas as principais características do vinagre de vinho e dos outros restantes vinagres comercializados em Portugal de acordo com a legislação nacional.

Tabela 2 - Principais características definidas pela legislação portuguesa relativa ao vinagre produzido em Portugal

	Vinagres de vinho	Outros vinagres
Acidez total (g/100mL ácido acético)	>6	>5
Álcool residual (% v/v)	1,5	0,5
Aspetto	Límpido, podendo admitir-se ligeiro depósito ou turvação.	-
Cor, Aroma, Sabor	Próprios da natureza da matéria-prima e dos ingredientes facultativos indicados no rótulo.	

Em termos de acidez total mínima, o limite definido para os vinagres de vinho é superior aos restantes exigindo assim que seja mais ácido em termos de valores mínimos.

Na legislação é autorizado o uso de auxiliares de fermentação, adições de água potável para diluir o álcool presente e ter uma acetificação normal, arejamentos, colorações com caramelo e ainda pasteurizações e esterilizações. Não são autorizadas matérias-primas em decomposição ou em estado que não seja adequado para a produção do vinagre.

2.5.2 Produção de vinagre

O vinagre é um produto alimentar obtido da acetificação de soluções resultantes da fermentação alcoólica de matérias-primas açucaradas ou amiláceas, tal como mosto de frutas, cereais, vegetais ou misturas dos mesmos. A sua qualidade está dependente da matéria-prima utilizada na sua elaboração, pelo processo de acetificação e ainda pela presença ou não do envelhecimento em madeira (Cruz, 2012).

2.5.2.1 Processo de Orléans (método lento)

É o método industrial mais antigo. Neste método são usadas barricas de madeira (Figura 2), as vinagreiras de mais ou menos 200 litros de capacidade, com orifícios na parte superior para permitir o arejamento e para se efetuar a regulação do nível de líquido a acetificar e um tubo em forma de J até ao fundo.

Para iniciar o processo, é adicionado cerca de 10% do volume útil da barrica com um vinagre não pasteurizado, com bactérias ativas, denominado de “pé-de-cuba”. No final, estas barricas são preenchidas entre a metade e 2/3 da sua capacidade máxima, sendo

adicionado semanalmente entre 10 e 15 litros do vinho ou mosto de fruta já com a fermentação alcoólica efetuada, durante um mês. Ao fim de cinco semanas, é retirada 20 litros desse vinagre finalizado e depois é reabastecida a vinagreira com o novo mosto fermentado a acetificar, pelo tubo em forma de J, para evitar a rutura da película sobre o líquido, e repetir o mesmo processo de adição de mosto, continuamente. Caso o vinagre retirado tenha um teor de álcool demasiado elevado é necessário prolongar o tempo da fermentação acética.

Este processo é contínuo e realizado a temperatura controlada a rondar os 25 °C, evitando assim a evaporação do álcool e todas as entradas e orifícios presentes na barrica são protegidas com telas finas para prevenir a entrada e contaminação por insetos atraídos por odores produzidos pelo vinagre. Aqui o fator limitante da produção será o fornecimento de oxigénio, sendo a produção feita em barricas sem sistemas de arejamento.

Este processo é lento, pouco produtivo e necessita de muito espaço, sendo atualmente usado exclusivamente para a produção doméstica e de vinagres mais artesanais. No entanto, com este processo obtemos um vinagre de boa qualidade, praticamente limpo, que não necessita de filtração ou clarificação (Cruz, 2012; Veloso, 2013).

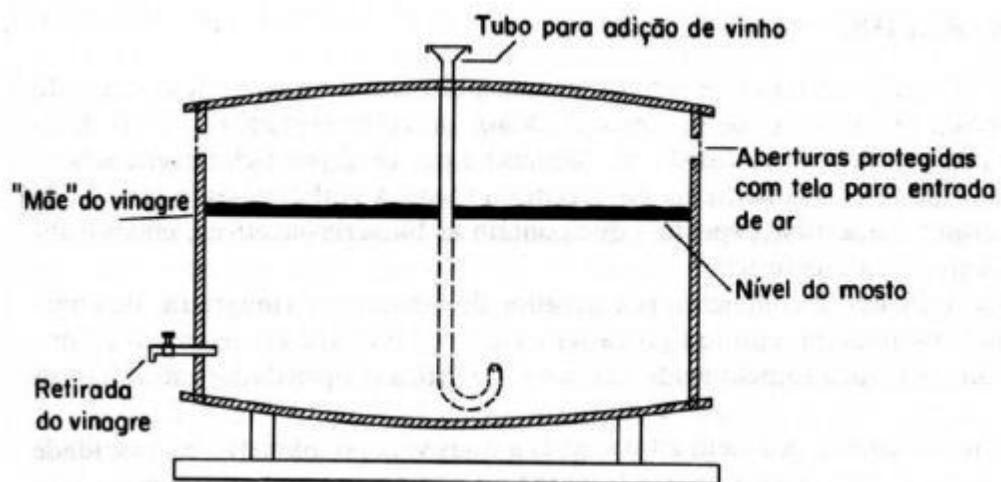


Figura 2 - Corte transversal de uma barrica vinagreira no processo lento (Fonte: Cruz, 2012)

2.5.2.2 Processo Alemão

Este processo foi desenvolvido a partir da observação da importância da aeração do vinho no processo de acetificação.

Este sistema de produção consiste em fazer o mosto fermentado passar através de recipientes com material que permita a passagem do ar, como por exemplo a madeira, onde as bactérias acéticas colonizam a superfície do material e oxidam o etanol em ácido acético.

A matéria-prima é forçada a circular entre a parte inferior até à parte superior do depósito. O mosto fermentado passa pela madeira onde as bactérias oxidam o conteúdo alcoólico em ácido acético. Uma vez completo o processo de acetificação, metade do depósito onde ocorreu a acetificação é descarregado, voltando a introduzir a mesma quantidade de mosto. Neste processo é obtido um vinagre de boa qualidade, mas com baixo rendimento. A acidez aumenta progressivamente conforme o líquido vai circulando sucessivamente duas ou três vezes pelo mesmo gerador ou através de geradores em série. Uma vez que se trata de um processo exotérmico, o líquido deve ser arrefecido antes de entrar novamente no gerador para não comprometer a viabilidade das bactérias nem levar à evaporação do álcool presente no mosto (Cruz, 2012; Filipa & Henriques, 2014; Veloso, 2013).

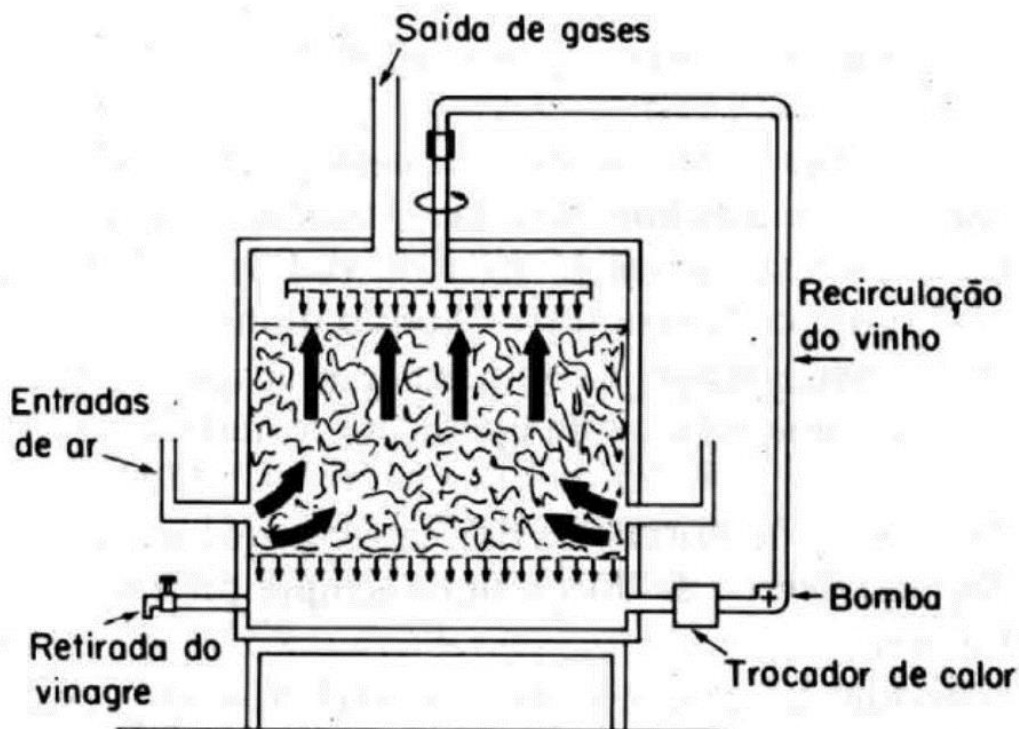


Figura 3 - Sistema utilizado no processo alemão de produção de vinagre (Fonte: Cruz,2012)

2.5.2.3 Produção Submersa

Neste processo as bactérias acéticas estão submersas no líquido a fermentar onde se vão multiplicar e oxidar o álcool em ácido acético. Neste método de produção é

importante o controlo do arejamento e que o mesmo seja homogéneo. Para tal, são utilizados depósitos de inox com turbinas de ar na parte inferior e sistemas de refrigeração.

O mosto fermentado é colocado no fermentador e inoculado com vinagre forte ou culturas de arranque de bactérias acéticas selecionadas. Este processo é o mais rápido em comparação aos referidos anteriormente, pois para além de permitir a completa automatização, permite a retirada diária de vinagre pronto, até ¼ do tanque, e reabastecer com o novo líquido a acetificar. Em contrapartida, este método requer um investimento inicial superior e necessita de mão-de-obra especializada para a manutenção, para além da obrigatória produção regular para que, mantendo o mesmo fluxo de arejamento, não haja variações na taxa de oxigênio presente na mistura. O vinagre resultante deste processo necessita de filtração devido à turvação resultante do crescimento celular (Veloso, 2013).

2.5.3 Processos metabólicos e microbiota envolvidos na produção de vinagre

Na produção de vinagre são aplicadas duas fermentações consecutivas, a fermentação alcoólica e posteriormente a acetificação Figura 4.

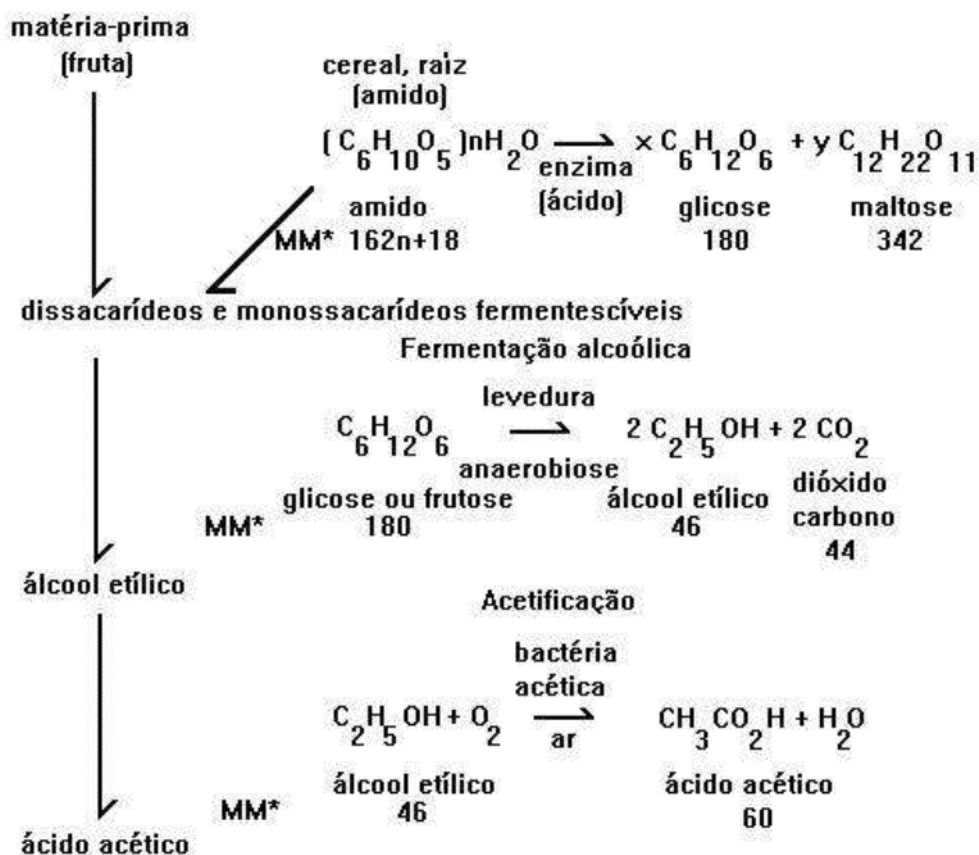


Figura 4 - Fluxograma dos processos metabólicos envolvidos na produção de vinagre (Fonte: Veloso, 2013)

Estes processos compreendem duas etapas que têm em comum a glicólise, em que as moléculas de glicose são degradadas a ácido pirúvico, (i) a redução do ácido pirúvico, que leva à produção dos metabolitos resultantes da fermentação alcoólica e (ii) a conversão do álcool em ácido acético através de um processo de acetificação.

Na glicólise, os açúcares são oxidados e formam-se duas moléculas de ácido pirúvico. O agente oxidante é o NAD⁺ que é transformado em NADH. Nesta etapa são formadas duas moléculas de ATP (adenosina tri-fosfato).

O ácido pirúvico é um aceitador dos eletrões do NADH, o que permite regenerar o NAD⁺. O NAD⁺ pode assim voltar a ser utilizado na oxidação da glicose com formação de duas moléculas de ATP.

Por outro lado, em presença de bactérias acéticas, o ácido pirúvico é convertido em etanol e CO₂, sendo o etanol convertido em ácido acético num processo que decorre apenas em presença de oxigénio (Filipa & Henriques, 2014).

2.5.3.1 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo biológico anaeróbico facultativo, utilizado pelos microrganismos para a obtenção de energia na forma de ATP a partir do consumo de açúcares e com produção de álcool etílico e CO₂ (Terra & Leite, 2017).

Na produção de vinagre a fermentação alcoólica pode ocorrer de duas formas distintas. Poderá ocorrer uma fermentação espontânea, resultado da microbiota naturalmente presente nos substratos a fermentar, ou poderá ocorrer uma fermentação por inoculação do mosto com culturas selecionadas e com melhor capacidade competitiva em relação às populações de microrganismos existentes no meio.

Quando se dá a fermentação alcoólica espontânea as espécies de leveduras encontradas são as do género *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e *Candida* na fase inicial, passando a predominar *Pichia* e *Metschnikowia* na fase intermédia e finalizando com a predominância da *Saccharomyces cerevisiae*, devido à sua maior resistência a meios com concentração de etanol e maior eficiência no consumo dos açúcares (Stepmann et al., 2015).

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura muito usada na produção de vinhos, cervejas e vinagres como inóculo de substratos ricos em açúcares, dadas as suas características de resistência a elevadas concentrações de etanol, resistência a valores de pH baixos e resistência ao stress osmótico resultante da elevada concentração de açúcares livres presente nos mostos. Na produção de vinagre, a utilização deste inóculo visa garantir

uma presença mínima de 10^6 UFC/mL no início da fermentação e assim acelerar e controlar o processo (Stepmann et al., 2015).

2.5.3.2 Acetificação

No processo de acetificação ocorre a produção de ácido. Este processo é realizado por microrganismos aeróbios capazes de converter o álcool em ácidos orgânicos.

Durante a produção do vinagre, as bactérias acéticas vão utilizar os metabolitos sintetizados na fermentação alcoólica, neste caso o etanol, para a produção de ácido acético pela ação das bactérias acéticas que fazem reações de oxidação incompleta com as enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). É nesta etapa que são produzidos também outros compostos que contribuem para as características finais do produto, como ésteres, cetonas, aldeídos e outros compostos fenólicos e aromáticos (Román-camacho et al., 2020).

Esta etapa está diretamente correlacionada com a etapa anterior da fermentação alcoólica, pois se forem produzidos baixos níveis de etanol pode vir não ocorrer a produção de ácido acético.

Outro dos fatores a ter em conta deve ser a área de contato da interface entre a fase líquida e fase gasosa, uma vez que quando maior esta for mais vai favorecer a biossíntese de ácidos e esterres e, conseqüentemente, a viabilidade das bactérias.

Os géneros de bactérias mais usadas para a produção de vinagre são *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter* e *Gluconobacter*, devido à sua elevada capacidade de oxidar o etanol em ácido acético e à resistência aos mesmos. Tal como na fase de fermentação alcoólica, esta fase pode também resultar da inoculação com vinagre não pasteurizado (*backslopping*) ou resultar da inoculação com estirpes comerciais (Román-camacho et al., 2020; Stepmann et al., 2015).

3 Materiais e métodos

3.1 Preparação do Substrato

Para o desenvolvimento destes produtos foram utilizados ananases dos Açores, cedidos pela empresa açoriana “Boa Fruta”. Os frutos foram processados individualmente, constituindo duplicados biológicos independentes.

Os frutos foram divididos em duas frações – polpa e casca – as quais foram trituradas separadamente usando uma máquina de sumos (*SilverCrest SFE 450 D2* – Hamburgo, Alemanha). O processamento das diferentes frações resultou em três tipos de substrato – sumo (produto da polpa e casca trituradas), fibra (sub-produto da polpa triturada) e casca (sub-produto da casca triturada) – posteriormente quantificados em termos percentuais (peso/peso).

Com vista ao total aproveitamento dos subprodutos do ananás, na produção de Tepache, para além das cascas do fruto, foi também usada a fração de fibras obtida. Ambos os produtos foram misturados e triturados um processador de alimentos (Bimby, Vorwerk) por 5 minutos à velocidade 9, sem aquecimento. O facto da matéria-prima ser triturada visou minimizar os passos de processamento por parte da indústria, contribuindo ainda para a criação de um produto com sabor mais intenso a ananás.

3.2 Desenvolvimento das bebidas fermentadas

3.2.1 Tepache

O Tepache é obtido por fermentação espontânea devido à microbiota autóctone existente na casca do ananás, não sendo tradicionalmente utilizadas culturas de arranque.

Na produção de Tepache foram usadas a fração casca e a fração fibra. Após o processamento dos frutos procedeu-se à produção do Tepache tendo sido testadas três diferentes concentrações de açúcar mascavado (Sidul).

O processo de produção da bebida, decorreu em duas etapas sucessivas, em etapa realizada em ambiente aeróbio e uma etapa realizada em ambiente com baixa concentração de oxigénio. Na primeira fase, foram usados frascos de vidro de 1 L, com 0,5 L de volume total ocupado, consistindo em uma mistura de 5% (p/v) de casca e 13,6% (p/v) de fibra de ananás, juntamente com 5, 10 ou 15% (p/v) de açúcar mascavado e água desmineralizada estéril até perfazer o volume total de 0,5 L. Após homogeneização, os frascos foram cobertos com gaze para permitir a fermentação em condições aeróbias e mantidos a 25 °C durante 48 h, tendo sido recolhidas amostras no início e após 24 e 48 h, para a realização de análises microbiológicas, físico-químicas e reológicas.

A segunda fase consistiu numa fermentação anaeróbia. Para tal, após a primeira etapa de fermentação, as bebidas foram filtradas usando gaze para remoção de uma fração significativa dos sólidos, transferidas para garrafas herméticas e mantidas a 25 °C durante 48h. Após este período, foram recolhidas amostras para a realização de análises microbiológicas, físico-químicas e reológicas.

As bebidas foram produzidas em triplicados biológicos, tendo dois sido usados para as análises anteriormente referidas e o terceiro usado para a avaliação sensorial.

3.2.2 Vinagre de ananás

A produção do vinagre de ananás realizada neste trabalho seguiu três linhas de produção diferentes. No primeiro caso (Vinagre S), inoculou-se o mosto de ananás com 10⁶ UFC/mL de mosto de uma estirpe comercial de *Saccharomyces cerevisiae* SafeAle S-04 (Fermentis) (K1), após 48h de fermentação adicionou-se um scoby de Kombucha acidificada. No segundo caso (Vinagre K), foi adicionado ao mosto apenas uma mãe de Kombucha muito acidificada e para no terceiro caso (Vinagre KS), adicionou-se em simultâneo no início da fermentação, 10⁶ UFC/mL da estirpe comercial *S. cerevisiae* SafeAle S04 e o mesmo scoby utilizado na produção do Vinagre K.

As fermentações ocorreram em frascos de 1L, com 0,5 L de volume total, em banho de água termostático a temperatura constante de 25°C, sem agitação. Os frascos foram cobertos com gaze para permitir a fermentação em condições aeróbias, tendo sido recolhidas amostras ao longo da fermentação para a realização de análises microbiológicas e físico-químicas.

Numa segunda fase, com o objetivo de avaliar a influência do arejamento, produziu-se um duplicado dos dois vinagres com um perfil sensorial mais rico, Vinagre S e K, em que foi adaptado um sistema de arejamento com a finalidade de tentar potenciar as reações de acetificação. No caso destes vinagres com arejamento, foi apenas analisada a evolução do pH e °Brix.

3.3 Caracterização química e nutricional dos Produtos

3.3.1 Determinação do pH

Para a determinação do pH, utilizou-se um potenciómetro (PHM92 LAB ph meter, Radiometer Copenhagen), previamente calibrado com soluções padrão de pH conhecido, de 4 e de 7. Para a leitura do pH, o sensor foi colocado em contato direto com 10 mL de amostra de *tepache* ou vinagre usando *falcons* de 15 mL. As medições foram realizadas em duplicado.

3.3.2 Determinação do Grau Brix

As amostras de *Tepache* e vinagre foram primeiramente centrifugadas a 16190xg durante 15 min, para sedimentar e remover resíduos sólidos e obter o sobrenadante. Após calibração do aparelho com água, foram usados 100 µL do sobrenadante para determinar o °Brix das amostras de *tepache* e vinagre.

O °Brix foi medido com um refratômetro digital (Hanna instrumentos HI96801) seguindo as instruções do fabricante.

3.3.3 Determinação da acidez titulável

Para determinar a acidez titulável das bebidas, em cada uma das suas fases de produção foram recolhidas amostras de cada dia da fermentação.

As amostras de *Tepache* e de vinagre foram diluídas de 1:50 em água desmineralizada, efetuando-se depois uma titulação com uma solução de NaOH a 0,1M até se atingir o intervalo de pH de 8,15 a 8,40. Foi igualmente utilizada uma solução de fenolftaleína como indicador de mudança de pH durante a titulação.

Foram registados os volumes gastos de solução e utilizados para se fazer os cálculos da acidez titulável, substituindo os respetivos valores na seguinte equação:

$$\% \text{Acidez (g/100g)} = \frac{V * N * \text{Eq. gr de ácido predominante}}{10 * m}$$

Equação 1 - Cálculo da acidez titulável

Nesta fórmula foi tido em conta o volume gasto de NaOH (V), a normalidade (N) da mesma, a constante, equivalentes grama de ácido predominante, e a massa de amostra usada (m).

Na equação foi considerado o valor de equivalentes grama de ácido predominante referente ao ácido acético para ambas as bebidas.

3.3.4 Determinação dos açúcares, etanol e ácidos orgânicos

As amostras recolhidas ao longo das duas fases da fermentação foram analisadas por HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência), para quantificação de açúcares, ácidos orgânicos e etanol.

Foram realizadas curvas de calibração para os diferentes açúcares (glucose e frutose), ácidos orgânicos (ácidos acético, láctico e cítrico) e etanol, existentes nas amostras.

As amostras de *tepache* e vinagre foram centrifugadas a 16190xg durante 15 min, para sedimentar e remover resíduos sólidos. O sobrenadante obtido foi posteriormente diluído (1:10) com uma solução de ácido sulfúrico a 50mM, centrifugado durante 5min e filtrado usando uma membrana de acetato de celulose de 0,2 µm de poro. A amostra filtrada foi novamente diluída (1:2) em ácido sulfúrico a 50mM.

Os padrões e as amostras foram analisados usando um sistema de HPLC da Waters, equipado com um Detetor de Índice de Refração (Refractive Index Detector 2414) e uma Coluna de Exclusão Iónica (Rezex™ ROA Organic Acid H+ (8 %) column, 300 × 7,8 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), a 65 °C, utilizado ácido sulfúrico (5 mM) como fase móvel, a um fluxo de 0,5 mL/min.

3.3.5 Determinação dos compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

3.3.5.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Para a determinação dos compostos fenólicos totais foi utilizado o método descrito por (Mohankumar et al., 2018) com algumas alterações.

O extrato que a analisar foi obtido pela diluição da amostra em metanol numa proporção de 1:10. Após 1h de extração foi feita uma centrifugação (Centrifuge 5810R) a 3220 G a 4°C durante 10 min, tendo sido recolhido o sobrenadante e conservado no frio até o momento de ser analisado.

As soluções a analisar foram preparadas com 150 µL do sobrenadante da amostra, 140 µL de solução de Folin e 2,4 mL de água desionizada, sendo posteriormente agitadas no vortex e deixadas a reagir durante 3 minutos para depois ser adicionado 300 µL de Carbonato de Sódio Anidro 1M, sendo agitadas novamente pelo vortex e deixadas em local escuro durante 2h. Após o período de espera, as absorvâncias foram lidas a 725 nm utilizando um espectrofotómetro (Agilent Technologies, Cary Series UV-Vis Spectrophotometer). Realizou-se o branco do método, substituindo o sobrenadante da amostra por água.

Os ensaios foram realizados em triplicado, sendo no final do tratamento os resultados finais apresentados em mg de ácido gálico/L de amostra. Os valores foram calculados com base numa curva de calibração feita com ácido gálico (Anexo 1).

3.3.5.2 DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante, foi adaptado o método DPPH descrito por (Brand-Williams et al., 1995; Pérez-jiménez, 2007). As amostras foram diluídas numa proporção de 1:5 em metanol, ficando a incubar durante 1h. Após este período,

centrifugaram-se as amostras numa centrífuga com controlo de temperatura (Centrifuge 5810R) a uma rotação de 3220xg, a 4°C durante 10min, recolhendo-se o sobrenadante que foi conservado no frio até ao momento da análise.

Para cada amostra preparou-se, em triplicado, uma solução com 100 µL de amostra a analisar e 3,9 mL de solução (preparada no dia) de DPPH (0,06 mM). As misturas foram agitadas no vortex, e colocadas no escuro à temperatura ambiente durante 40 min. Após este período de espera leu-se a absorvância a 515 nm num espectrofotómetro (Agilent Technologies, Cary Series UV-Vis Spectrophotometer). A curva de calibração foi realizada com uma solução de trolox e metanol em que se variou a concentração do trolox e leu-se as respetivas absorvâncias das respetivas soluções. Os resultados finais são expressos em concentração de trolox em µmol/L.

3.3.5.3 FRAP

Para esta análise foi usado o método proposto por (Rufino et al., 2006). A obtenção do sobrenadante da extração foi feita da mesma maneira que para o DPPH, referido no ponto anterior, mas com uma diluição de 1:10 em metanol.

Foram preparadas em triplicado soluções com 90 µL da amostra com adição de 270 µL de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP. A solução FRAP foi preparada por mistura de TPTZ (10 mM), Cloreto Férrico 20 mM e Tampão acetato 3 M, adicionados na respetiva ordem na proporção 1:1:10. Após agitação no vortex, as soluções foram colocadas num banho-maria (Thermo Scientific Precision 2864 Water Bath) a 37°C durante 30 min e leu-se a respetiva absorvância a 595 nm num espectrofotómetro (Agilent Technologies, Cary Series UV-Vis Spectrophotometer). Tal como no DPPH, a curva de calibração foi feita com solução de trolox com metanol, sendo no final os resultados expressos em concentração de trolox em µmol/L.

3.4 Caracterização microbiológica: Determinação da viabilidade celular (UFC/mL) e células viáveis totais (hemocítómetro)

3.4.1 Meios de cultura

No caso da produção de *Tepache*, foram usados os meios YPD com cloranfenicol (*Yeast Extract Peptone Dextrose*, contendo 5 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de glucose, 10 g/L de peptona e 20 g/L Agar e 50mg/L de cloranfenicol), e MRS com natamicina, com 53.3 g/L de MRS Broth e 20 g/L de agar e 0,1 g/L de natamicina. Estes meios foram escolhidos com o objetivo de os inocular com a bebida e analisar o aparecimento de colónias de leveduras e lactobacilos, respetivamente.

No caso da produção de vinagre, foram utilizados os meios YPD com cloranfenicol e GYC com natamicina (*Glucose, yeast extract and calcium carbonate*, 50 g/L de glucose, 10 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de carbonato de cálcio e 27 g/L de agar -adicionado após pH estabilizado no valor de 4,5 com ácido acético glacial- e 0,1 g/L de natamicina), este último visando promover o crescimento das bactérias acéticas.

3.4.2 Contagens de microrganismos

As amostras recolhidas foram diluídas seriadamente de 10^{-1} até 10^{-5} e inoculadas por espalhamento à superfície, em duplicado para ser possível contar as colónias presentes e obter um valor médio e desvios padrões. No final, os resultados foram apresentados em UFC/g de amostra.

As placas inoculadas foram incubadas à temperatura ambiente até ser possível identificar e distinguir as diferentes colónias para então serem contadas e isoladas, sendo atribuído um código a cada colónia.

3.4.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA transferiu-se biomassa das culturas puras em meio YPD, com o auxílio de um palito estéril, para microtubos contendo 30 μ L de uma solução de SDS a 0,2% (p/v). Após 5 minutos à temperatura ambiente, agitou-se no vortex por 3 minutos e incubou-se a -80°C durante 2 minutos, sendo depois aquecidas a 100°C durante 2 minutos. Este procedimento foi repetido uma segunda vez para assegurar a lise completa. No final, centrifugou-se a $16000xg$ durante 1 minuto e recolheu-se o sobrenadante para posteriormente ser utilizado na amplificação do DNA por PCR.

3.4.4 Amplificação de DNA

A fim de identificar por métodos moleculares as principais leveduras presentes durante a produção de Tepache procedeu-se à amplificação da região ITS utilizando os *primers* ITS1 (10 nM) e ITS4 (10 nM) (Tabela 3) e a mistura reacional indicada na Tabela 4.

Tabela 3 - Sequências dos primers ITS1 e ITS4 utilizados nas reações de PCR

Primer	Sequência (5'-3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Tabela 4 - Mistura reacional utilizada nas reações de PCR (valores por amostra)

	Volume (µL)
HF Buffer 5X	5
H2O mili-Q estéril	40
ITS1	1
ITS4	1
dNTPs	1
Taq	1
DNA	1
Volume Total	50

O sobrenadante da extração efetuada de acordo com o descrito em 3.4.3.

O PCR foi realizado num termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Alemanha), com o programa pré-definido ITS1, segundo o descrito abaixo:

Tabela 5 - Programa de PCR utilizado

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95	10	1
Desnaturação	95	1	30
Embrulhamento	49	1	
Extensão	72	1	
Extensão final	72	7	1

3.4.5 Quantificação do produto PCR

O DNA amplificado por PCR foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1% em 50 mL de TAE 1x (tampão) ao qual foi adicionado 2 µL de Greensafe (NZYTech, Portugal). As amostras foram preparadas com 10 µL de produto e 2 µL de loading dye (corante) (NZYTech, Portugal). Para determinação do tamanho e quantificação dos fragmentos amplificados, utilizou-se no mesmo gel uma amostra de DNA digerido com a enzima de restrição *Hind* III e o marcador Ladder I (NZYTech, Portugal),

O gel correu-se a 70 V durante 45 min para as amostras das leveduras analisadas e observou-se o gel num transiluminador.

3.4.6 Sequenciação de DNA

O DNA amplificado foi purificado, através do kit de purificação de DNA Wizard R SV gel and PCR clean-up system (Promega, Winsconsin, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado. As amostras purificadas foram enviadas para sequenciação pela STABVida (Lisboa, Portugal) utilizando os primers ITS1 e ITS4.

Por fim, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências existentes nas bases de dados de acesso livre (NCBI) utilizando a plataforma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a fim de identificar as leveduras isoladas.

3.5 Caracterização física dos Produtos

3.5.1 Ensaio Reológicos – Viscosidade

Para esta metodologia utilizou-se um reômetro de tensão controlada (MARS III, HAAKE MARSIII) equipado com um sensor de cilindros concêntricos.

Os testes à viscosidade foram realizados numa sala a uma temperatura ambiente constante de 20°C, para garantir que não houvesse oscilação de temperatura que pudessem influenciar os resultados. Antes de iniciar o teste, realizou-se a calibração do sensor, em que de forma a definir a distância do sensor em relação ao fundo do poço onde é colocada a amostra. Após a calibração foram colocados 16,5 mL de amostra no poço, deixou-se estabilizar o líquido 5 min (300s), e realizou-se a medição, aplicando velocidades de deformação ($\dot{\gamma}$) diferentes de forma crescente, e efetuando em simultâneo a recolha dos valores de viscosidade observada (η).

Após a recolha dos dados, foi feito um ajustamento ao modelo de Cross com o auxílio do programa Data Manager, que deu a equação da reta mais adequada aos valores observados e assim, através da substituição desses mesmos valores na reta obtemos a viscosidade aparente das amostras. Os testes foram realizados em triplicado, para assim se calcular os valores médios e respetivos desvios padrões.

3.5.2 Colorimetria

Na medição da cor, foi considerado o sistema CIELAB, que possui duas coordenadas relativas à cor, a^* e b^* , e um indicador de luminosidade, L^* . Ambas as coordenadas estão compreendidas num intervalo de valores que podem tomar:

- L^* - a variar entre 0 (zero) e 100, representando, respetivamente, o escuro e o claro;
- a^* - a variar entre -60 e 60, representando, respetivamente, o verde e vermelho;
- b^* - a variar entre -60 e 60, representando, respetivamente, o amarelo e azul (Granato & Masson, 2010).

As medições das coordenadas de cor das amostras foram feitas com um colorímetro (Iluminante D65) o qual foi calibrado com um branco antes de efetuar a avaliação da cor das amostras. As medições foram realizadas em triplicado.

A variação da cor das amostras ao longo da fermentação foi determinada a partir do parâmetro ΔE , calculado de acordo com a Equação 2.

$$\Delta E = \sqrt{((L_f - L_i)^2 + (a^*_f - a^*_i)^2 + (b^*_f - b^*_i)^2)}$$

Equação 2 – Equação da variação das coordenadas relativas à cor entre a fase final e inicial da fermentação

3.6 Avaliação sensorial por um painel de provadores e de consumidores com base em inquéritos.

As três formulações do Tepache, 5%, 10% e 15%, foram analisadas sensorialmente por um painel não treinado que contou com 30 provadores, de ambos os sexos e numa faixa de idades entre os 22 anos e os 40 anos.

A prova foi feita numa sala apropriada, previamente reservada para o efeito, onde os provadores foram sentados separadamente e aos quais foram distribuídos copos plásticos, com 20ml de cada formulação da bebida, identificando as amostras no copo com o seu respetivo código. A bebida foi servida fresca, com uma temperatura entre os 5°C e os 10°C.

3.7 Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado no programa GraphPad Prism5. Os resultados foram submetidos à análise de variância e foi aplicado o teste de Tukey para um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Nesta análise, o objetivo foi verificar a existência de diferenças significativas entre os resultados observados nas amostras da bebida acabada e assim concluir a existência ou não de influência da concentração de açúcar das formulações nos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e reológicos da bebida.

4 Resultados e discussão

A. *Tepache* a partir de mosto de ananás DOP dos Açores

4.1 Obtenção da matéria-prima - rendimento

Na produção tradicional de *Tepache*, é comum as cascas do ananás serem usadas inteiras, juntamente com água e açúcar mascavado para obtenção desta bebida fermentada. Neste caso, e para testar o total aproveitamento dos subprodutos do ananás, além das cascas do fruto, foi também usada a fração de fibras obtida. O facto de a matéria-prima ser triturada visou minimizar os passos de processamento por parte da indústria, contribuindo ainda para a criação de um produto com sabor mais intenso a ananás. O *Tepache* é obtido por fermentação espontânea devido à microbiota autóctone existente na casca do ananás, não sendo tradicionalmente utilizadas culturas de arranque.

Com a finalidade de estimar o rendimento que seria obtido a partir do fruto processado, determinou-se o volume de cada uma das frações obtidas (casca, fibra e sumo). Na Tabela 6 são apresentados os valores percentuais médios de cada um dos constituintes do ananás após a sua trituração e pesagem de cada um dos substratos obtidos.

Tabela 6 – Valores médios percentuais (p/p) dos três tipos de substrato (casca, fibra e sumo) na composição do ananás dos Açores (média \pm dp, n=4).

	%
Casca	16 \pm 0,02
Fibra	42 \pm 0,09
Sumo	35 \pm 0,02
Total	93

* O somatório das frações é inferior a 100% devido a perdas durante o processamento da matéria-prima e erros associados à pesagem.

Pela análise dos resultados é possível verificar que a maior fração corresponde à fibra, sendo equivalente a cerca de 45% do produto processado.

4.2 Evolução Microbiológica do *Tepache*

Ao longo das duas etapas de fermentação, foram recolhidas amostras que foram usadas para realizar análises microbiológicas ao *Tepache*, com a finalidade de quantificar e identificar a microbiota envolvida na fermentação espontânea bem como monitorizar o seu crescimento ao decorrer do processo fermentativo das diferentes formulações.

As amostras recolhidas foram plaqueadas em meios seletivos com antibiótico de forma a permitir observar cada um dos dois grupos de microrganismos que seria expectável estarem presentes ao longo da fermentação (leveduras e bactérias lácticas). Tal como

esperado, foram identificadas várias colónias diferentes quer de leveduras quer de bactérias lácticas.

No caso das leveduras, a observação das placas permitiu verificar a presença de dois tipos de colónias diferentes e dominantes que se encontravam presentes nos três Tepaches produzidos: um grupo de colónias de cor cinzenta-esbranquiçada com algum brilho, com um perfil mais regular e convexo (levedura 1), que quando visualizada ao microscópio apresentou formas redondas (Figura 5) e 2) um segundo tipo de colónias, que correspondia a colónias de cor cinzenta com um ponto central e uma margem transparente (levedura 2), e que quando observadas ao microscópio apresentaram células em forma de limões (Figura 6).

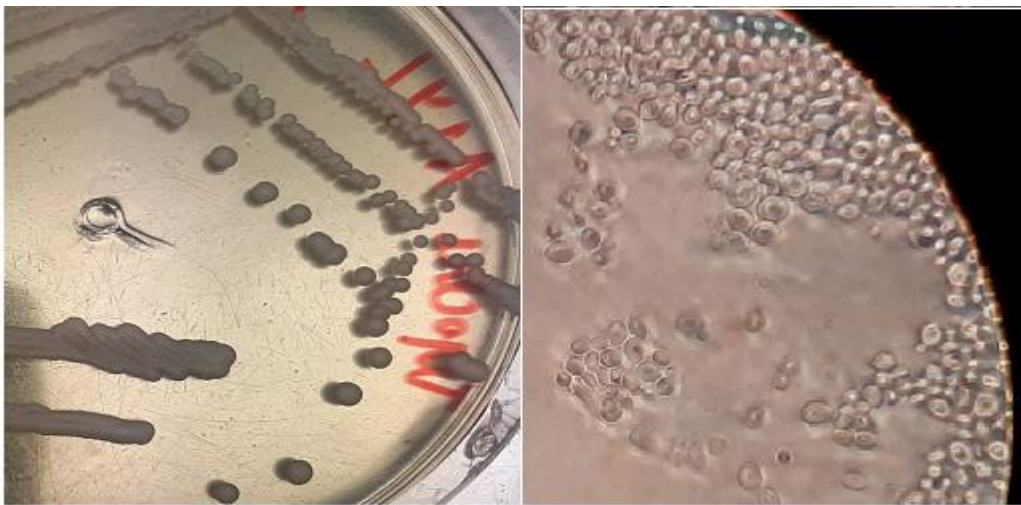


Figura 5 - Aspeto visual das colónias isoladas da Levedura 1 após 24h de inoculação em meio de YPD e respetiva imagem obtida por microscopia (objetiva 100x)

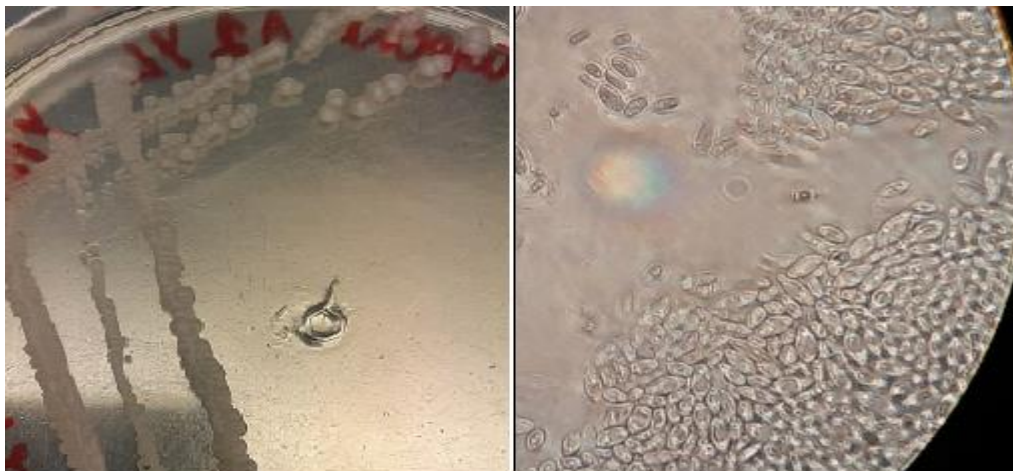


Figura 6 - Aspeto visual das colónias isoladas da Levedura 2 após 24h de inoculação em meio de YPD e respetiva imagem obtida por microscopia (objetiva 100x)

Para estas duas, extraiu-se o DNA genómico, amplificou-se um fragmento com primers específicos para a região ITS (ITS1 e ITS4). A análise comparativa das sequências com as sequências da mesma região presentes na base de dados NCBI, permitiu identificar a Levedura 1 como sendo *Meyerozyma caribbica* e a levedura 2 como sendo *Hanseniaspora opuntiae*. Este resultado vem ao encontro do descrito por Rodríguez-González e colaboradores (2010), que refere que em fermentações espontâneas de *Tepache*, foram identificadas leveduras do género *Hanseniaspora sp.*, *Candida apícola*, *Cryptococcus skinneri* e *Saccharomyces sp.* estando a microbiota naturalmente presente nas cascas do ananás muito relacionada com o modo e ambiente de produção (Rodríguez-González, 2010).

Da Figura 7 até à Figura 9 são apresentados os gráficos com a evolução das duas principais leveduras presentes na fermentação espontânea, verificando-se que levedura predominante no processo fermentativo foi a *Hanseniaspora opuntiae*, que esteve presente em todas as formulações com valores de 10^6 UFC/g.

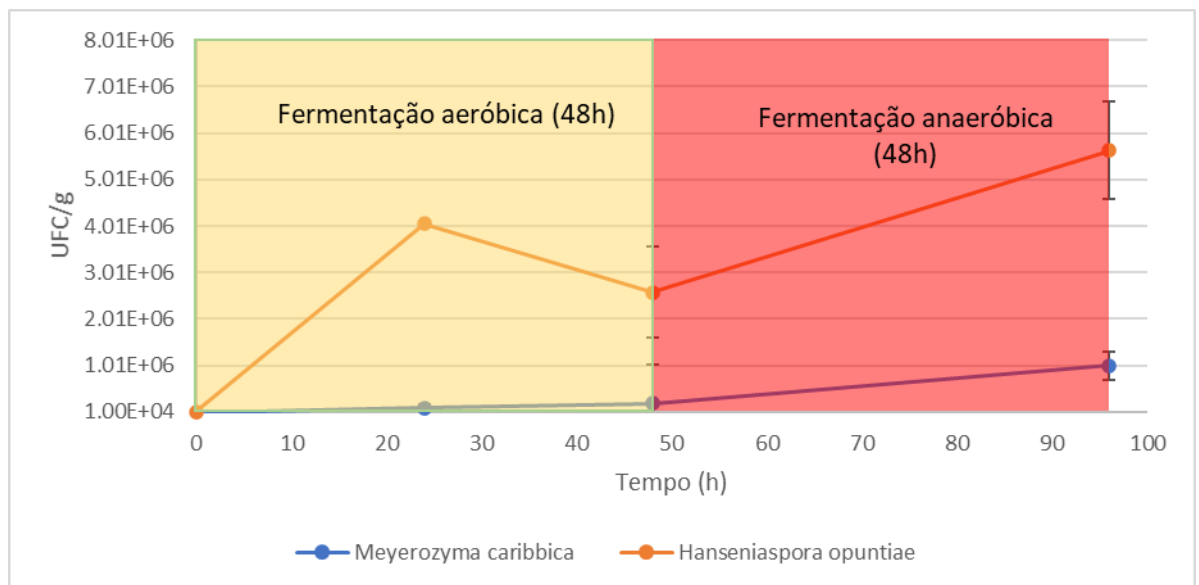


Figura 7 - Evolução do número de células viáveis cultiváveis de leveduras ao longo do processo de produção do Tepache 5%

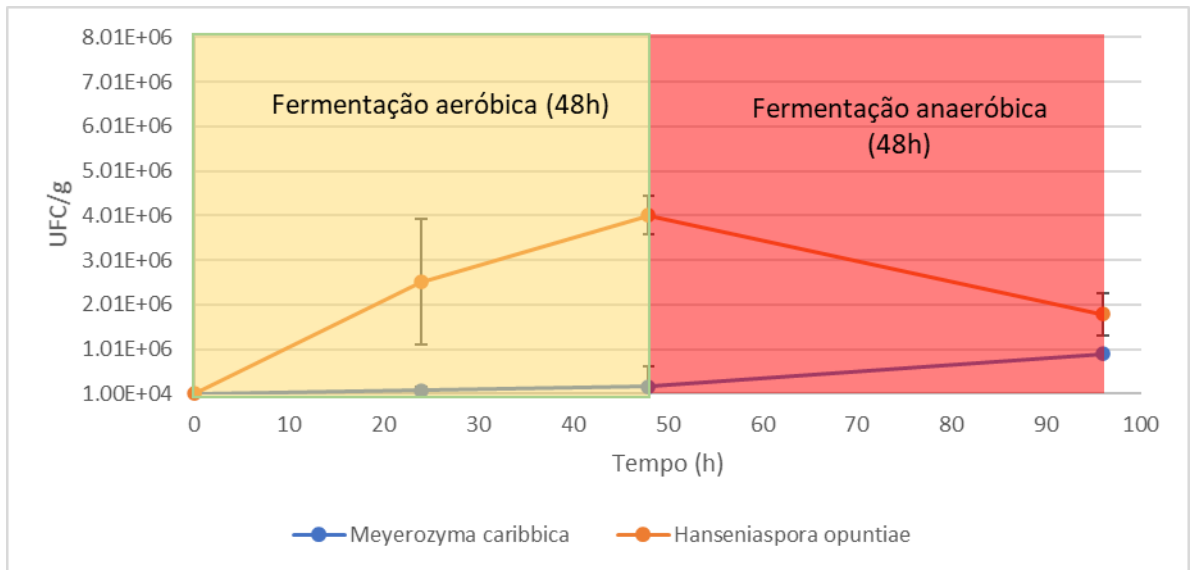


Figura 8 - Evolução do número de células viáveis cultiváveis de leveduras ao longo do processo de produção do Tepache 10%

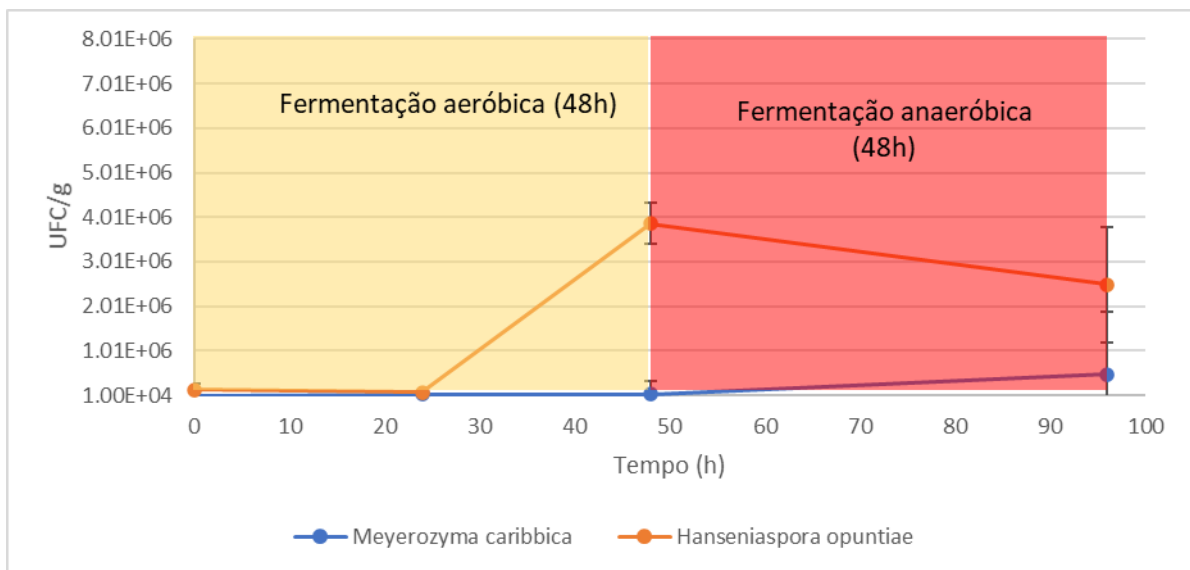


Figura 9 - Evolução do número de células viáveis cultiváveis de leveduras ao longo do processo de produção do Tepache 15%

As formulações com 5%(m/v) e 10% (m/v) de açúcar foram as que mostraram um aumento mais acentuado do número de células viáveis cultiváveis nas primeiras 48h. De entre estes, o *Tepache* produzido com 5% de açúcar foi o que teve maior crescimento nas primeiras 24h, observando-se, no entanto, uma redução considerável até às 48h, sendo depois o único que aumentou durante a fermentação em condições de baixo teor de oxigénio no meio. A formulação com 15% foi aquela em que se observou um crescimento de leveduras mais lento, o que poderá ser indício de que a concentração de açúcar possa

provocar um stress osmótico e inibir o crescimento das respetivas leveduras, sendo por isso a formulação com o processo fermentativo mais lento.

No caso das bactérias ácido lácticas (Figura 10), comparando formulações, podemos observar muitas oscilações no seu crescimento com diferenças importantes, o que é expectável, pois segundo a bibliografia referente ao *Tepache*, Escobar-Ramírez et al., (2020) refere um crescimento destas bactérias com uma fase estacionária inconstante, variando entre valores de 10^6 e 10^8 UFC/mL (Escobar-Ramírez et al., 2020), o que vai de encontro aos valores obtidos neste trabalho, como se pode ver pela Figura 10, onde se apresenta a evolução das três formulações em termos de crescimento populacional das bactérias.

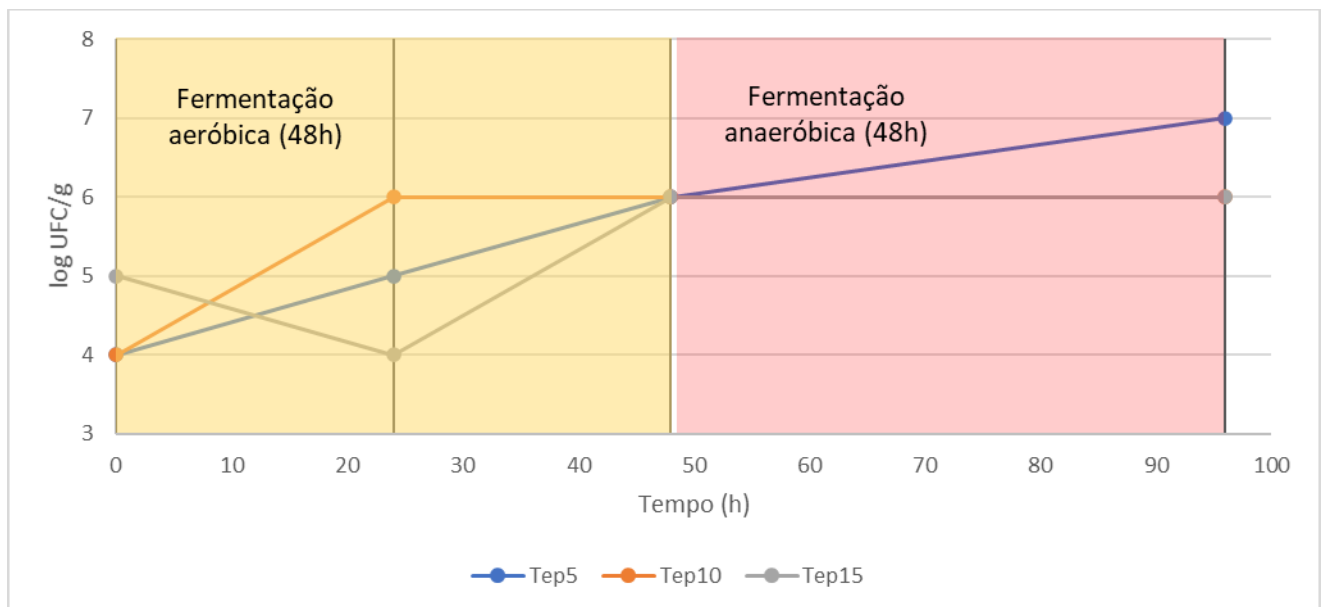


Figura 10 - Evolução do número de células viáveis cultiváveis de bactérias ácido lácticas ao longo do processo de produção das diferentes formulações do *Tepache*

4.3 Evolução dos valores de pH e da acidez titulável ao longo do processo

Neste trabalho foi avaliada a evolução do pH ao longo da produção da bebida bem como a sua acidez titulável ao longo da fermentação (Figura 11). Tal como era expectável, a variação entre ambos é inversamente proporcional em todas as formulações usadas.

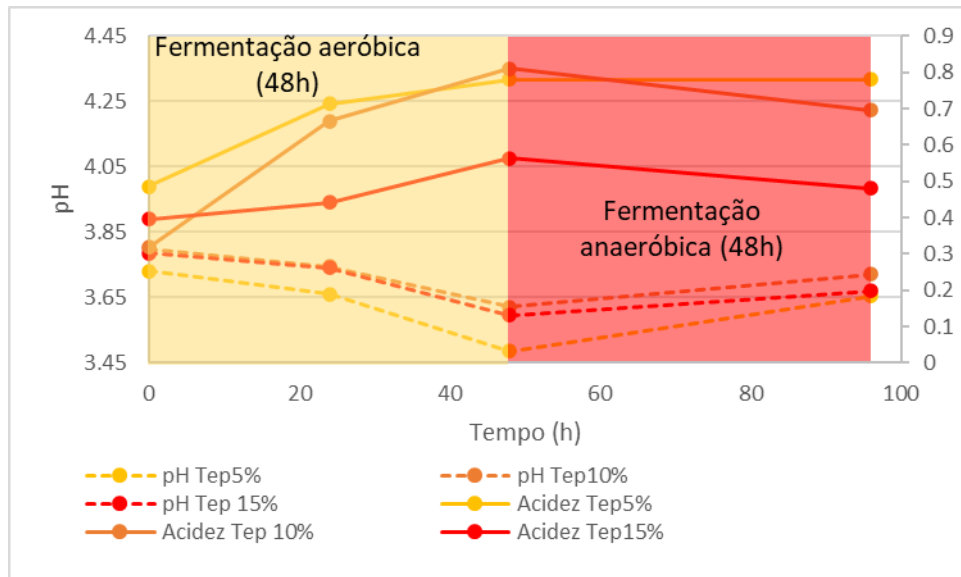


Figura 11 - Evolução do pH e acidez total no Tepache ao longo do tempo de fermentação

Em ambas as formulações, o pH manteve um valor inferior a 4 e quando se efetuou o engarrafamento, após as 48h de fermentação aeróbica, e se manteve uma temperatura constante de 25 °C verificou-se um aumento do pH e a redução na acidez, exceto no *Tepache* de 5% em que a acidez se manteve.

Estes valores de pH estão próximos ao intervalo de valores reportados pela bibliografia (Moreno Terrazas Casildo, 2005), os quais referem valores finais de pH entre 3.22 e 3.66, e para a acidez total, expressa em ácido acético, é referido um intervalo de 0.21 a 0.04. Os mesmos autores referem ainda que estes valores podem variar muito devido aos fatores de produção tal como o tempo de fermentação, temperatura e as condições de maturação e produção da matéria-prima, bem como com o local de produção e técnicas culturais usadas. Estes fatores acabam por influenciar as características da própria fruta, que por sua vez influencia a evolução do pH e da acidez do *Tepache*.

Apesar de ser expectável uma diminuição de uma a duas unidades ao longo do processo de fermentação, resultado da ação das bactérias ácido-láticas (Moreno Terrazas Casildo, 2005) o facto de o pH inicial já ser por si só inferior a 4, poderá inibir o metabolismo das bactérias lácticas e acéticas (microrganismos maioritariamente responsáveis pela produção de ácidos orgânicos) levando a que não se observe o mesmo abaixamento registado por outros autores.

4.4 Grau Brix

Para além do pH e da acidez titulável, o processo foi seguido através da determinação do °Brix nas várias etapas.

Ao analisar o °Brix das amostras recolhidas ao longo do processo fermentativo (Figura 12), é possível verificar que no geral houve uma redução do valor deste parâmetro, correspondendo a uma redução dos compostos solúveis. O decréscimo observado corresponde a uma redução na concentração de açúcares, consumidos pela leveduras e bactérias durante o processo fermentativo.

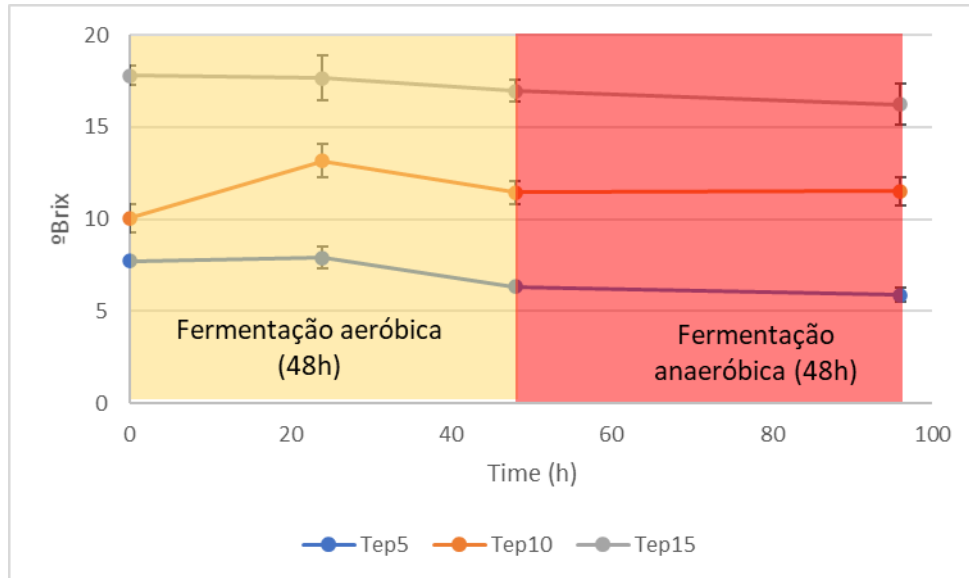


Figura 12- Evolução do °Brix ao longo do tempo de fermentação de cada formulação de Tepache

4.5 Evolução da concentração de açúcar nas diferentes formulações do Tepache com a metabolização dos açúcares livres e produção de álcool e ácidos

4.5.1 Evolução dos açúcares ao longo do tempo de fermentação

Com a finalidade de analisar o consumo de açúcares do substrato e a concentração dos produtos resultantes da fermentação, foram analisadas por HPLC as amostras recolhidas ao longo do processo fermentativo de cada uma das formulações da bebida.

Nas Figura 13 até à Figura 15 são apresentados os gráficos com a evolução das concentrações em açúcares livres (Frutose e Glucose) para cada uma das formulações do Tepache.

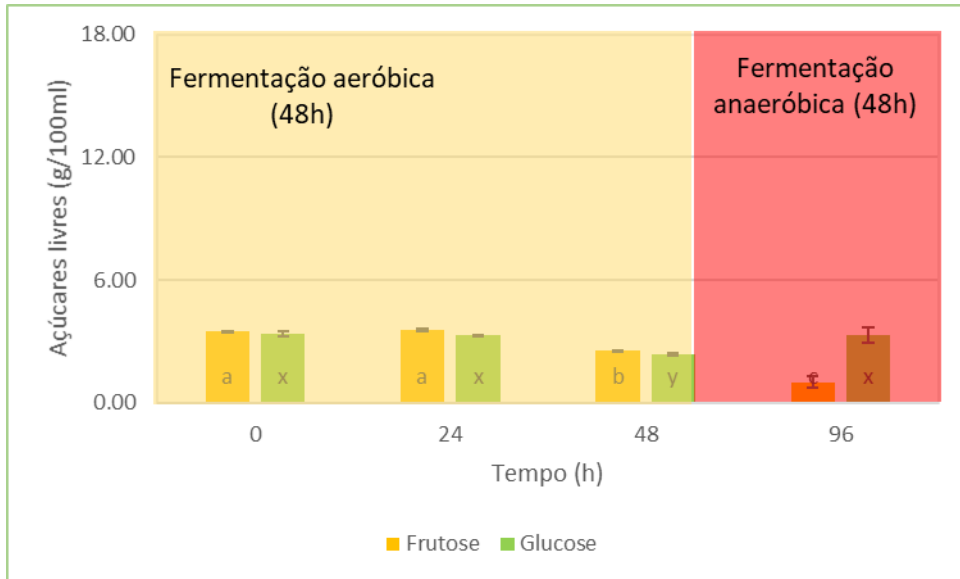


Figura 13 - Evolução da concentração de açúcares ao longo do processo fermentativo do Tepache 5% *letras diferentes indicam diferença significativa entre valores ($p < 0.05$)

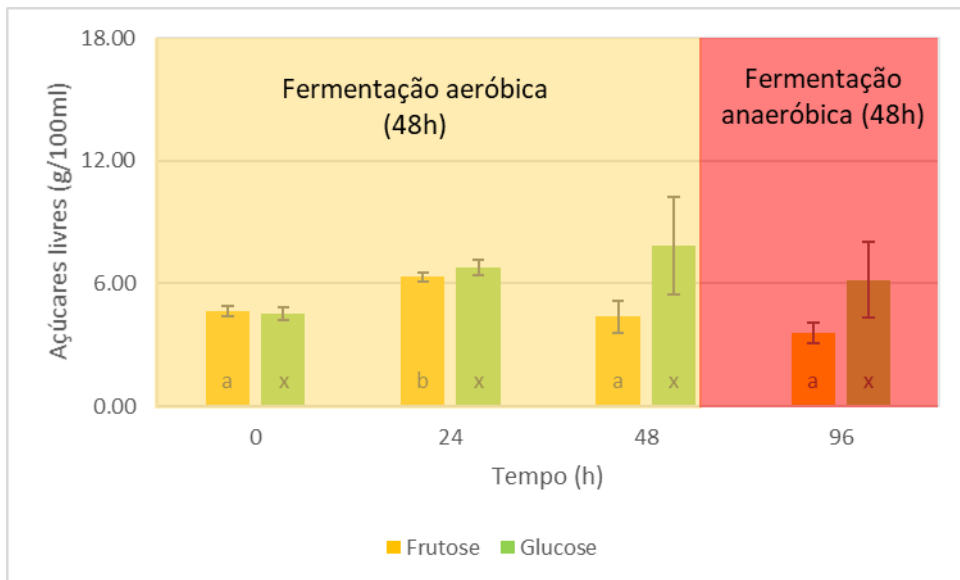


Figura 14 - Evolução da concentração de açúcares ao longo do processo fermentativo do Tepache 10% *letras diferentes indicam diferença significativa entre valores ($p < 0.05$)

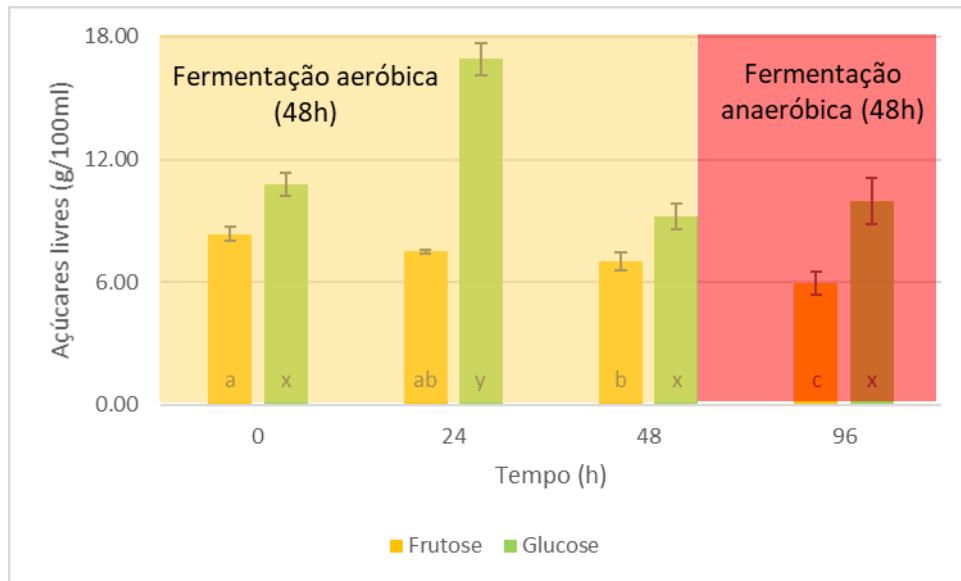


Figura 15 - Evolução da concentração de açúcares ao longo do processo fermentativo do Tepache 15% *letras diferentes indicam diferença significativa entre valores ($p < 0.05$)

Podemos ver pelas figuras apresentadas que nas formulações com 10% e 15% de açúcar houve o aumento da glucose e da frutose na fase inicial, tendo sido este aumento menos visível na formulação com 5% de açúcar. Este aumento da concentração de açúcares totais poderá resultar de uma hidrólise por parte da atividade microbiana sobre moléculas mais complexas, o que leva à síntese de açúcares mais simples e biodisponíveis. Às 48h de fermentação, antes do engarrafamento da bebida e de se iniciar a segunda fermentação que decorreu em frasco fechado e na ausência de agitação e arejamento, verifica-se uma redução mais acentuada dos açúcares totais, coincidindo com o ponto em que a população de leveduras apresenta valores mais elevados.

Podemos inferir que para este tempo de fermentação, a variação da glucose não variou significativamente ($p < 0.05$), ao contrário da frutose nas formulações de 5 e 15% em que tiveram uma redução significativa entre o início e fim do processo fermentativo.

4.5.2 Evolução do álcool ao longo do tempo de fermentação

A análise do álcool presente na bebida (Figura 16) revelou valores entre 4.48 a 5.29% de etanol, muito acima do descrito na bibliografia que refere um valor esperado para a bebida entre 0.14 a 0.61% de etanol, sendo a bebida *Tepache* caracterizada como de baixo teor alcoólico (Moreno Terrazas Casildo, 2005). Estes valores podem ser facilmente justificados pelo facto de as matérias-primas terem origens geográficas diferentes, o que faz com que o ambiente em que tenha sido feito o cultivo seja diferente levando a que possa haver diferenças significativas na microbiota existente nas cascas bem como no substrato disponível para o desenvolvimento do mesmo, que em caso de fermentação espontânea origina produtos com características distintas.

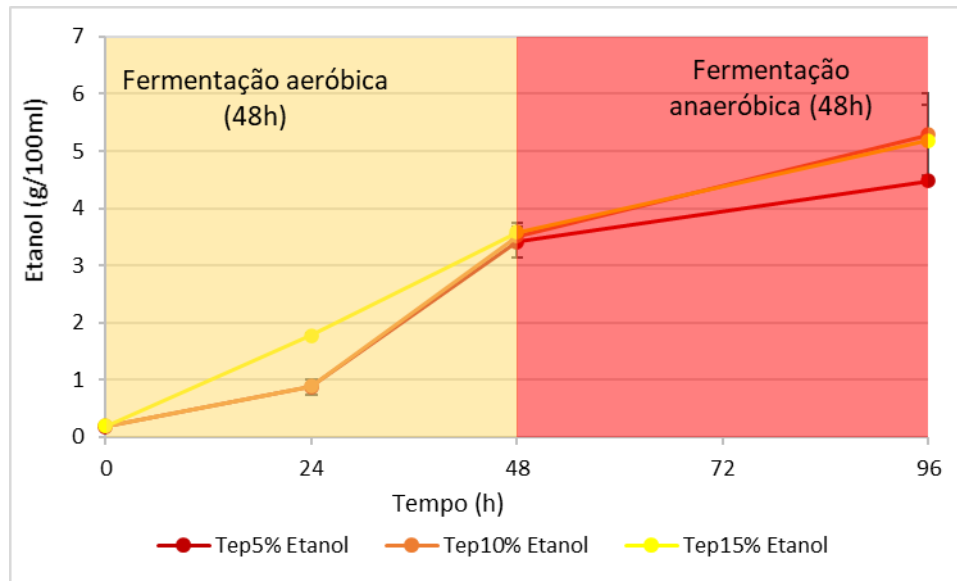


Figura 16 - Evolução do teor alcoólico ao longo da fermentação do Tepache

Nestes resultados podemos ver a influência da concentração de açúcar de cada solução, onde foram colocadas a fermentar as cascas, com os restantes fatores. Das três formulações, é possível inferir que à partida quanto maior a disponibilidade de açúcares para que ocorra a fermentação alcoólica maior será o teor de álcool final, como podemos ver na formulação com menor concentração de açúcar que demonstrou menor teor alcoólico. Curiosamente, no caso da formulação com 15%, o teor alcoólico da bebida foi similar ao observado na formulação com 10% de açúcar adicionado, o que poderá dever-se ao facto de o excesso de açúcar ter provocado inicialmente um stress osmótico que retardou o arranque na fermentação alcoólica, podendo desta forma não ter tido tempo de fermentação suficiente para produzir mais álcool.

Estando o teor de álcool relacionado com a quantidade de açúcar inicial e pH inicial (Corona-González, R. I. et al., 2013; Moreno Terrazas Casildo, 2005) para se conseguir atingir valores inferiores de álcool, similares aos indicados como característicos do Tepache, a solução poderia estar em reduzir a quantidade de açúcar adicionado inicialmente ou aumentar o volume de água incorporado na mistura onde são colocadas as cascas do ananás a fermentar.

4.5.3 Evolução dos ácidos ao longo do tempo de fermentação

Durante a produção de *Tepache*, são produzidos o ácido láctico e o acético, cujas concentrações estão correlacionadas com as condições de produção, nomeadamente com a concentração inicial de açúcar da solução, com o tempo de fermentação e com a temperatura (Corona-González, et al., 2013). Neste trabalho a única condição que variou foi

a concentração de açúcar da solução, *Tepache* com 5%, 10% e 15% de açúcar, tendo sido constante a temperatura e tempo de fermentação.

A análise por HPLC das bebidas ao longo do processo (Figura 17) apenas permitiu detetar a produção de ácido acético, observado em todas as amostras.

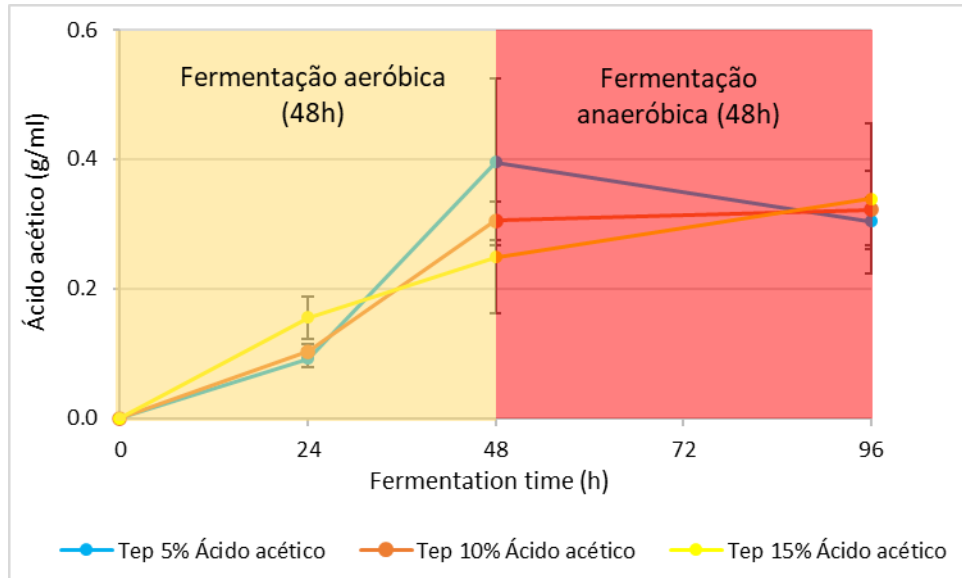


Figura 17 - Evolução do ácido acético ao longo da fermentação do *Tepache*

Como se pode verificar na Figura 17, os valores finais de ácido acético em g/100ml para ambas as formulações foram semelhantes, o que não demonstra efetivamente alguma influência da concentração inicial da solução açucarada nos valores de ácido acético produzido, sendo que a temperatura e tempo de fermentação foram iguais para todas as formulações. Estes valores são semelhantes aos encontrados por Corona-González, et al., (2013) para a concentração de ácido acético em *Tepaches* produzidos em condições similares.

4.6 Evolução do teor em compostos com propriedades antioxidantes

Com vista a avaliar possíveis benefícios para a saúde das bebidas fermentadas produzidas, determinou-se o teor em compostos fenólicos totais bem como o potencial antioxidante nos três tipos de *Tepache* produzidos.

Os dados obtidos (Figura 18) permitem observar um ligeiro aumento do teor em compostos fenólicos até ao momento do engarrafamento para os *Tepaches* com 5 e 10% de açúcar adicionado, mas após engarrafamento e dado o início à fermentação em condições de baixo teor de oxigénio, estes valores diminuem para valores próximos aos iniciais do tempo 0. Em termos de variação ao longo da fermentação (para um $p < 0.05$), não foram verificadas nenhuma variação significantes em ambas as formulações.

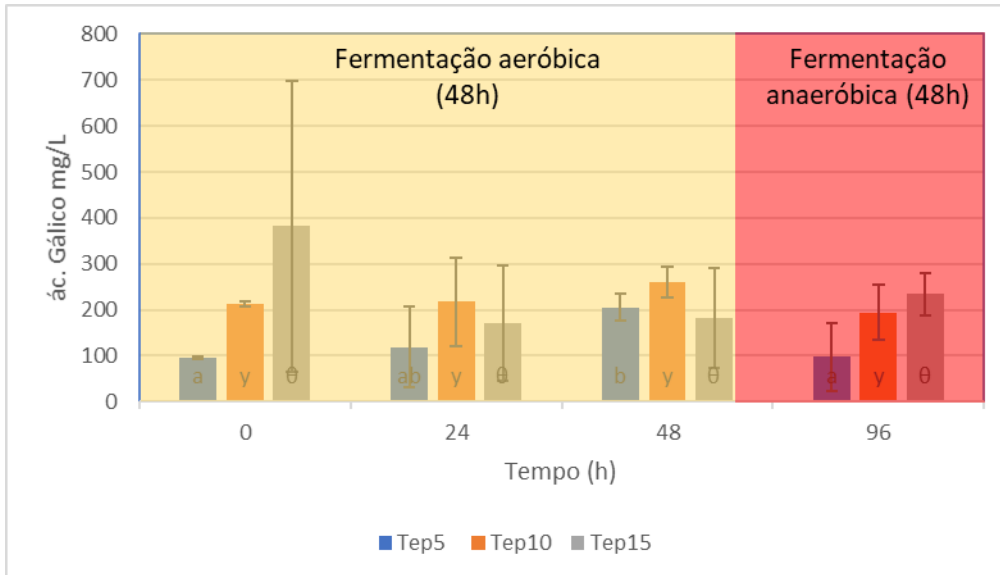


Figura 18 - Influência do tempo de fermentação com a evolução dos fenóis totais presentes na bebida *letras ou símbolos diferentes indicam diferença significativa entre valores ($p < 0.05$)

A evolução da atividade antioxidante ao longo do tempo de fermentação, determinado pelos métodos DPPH e FRAP, está representada na Figura 19 e Figura 20.

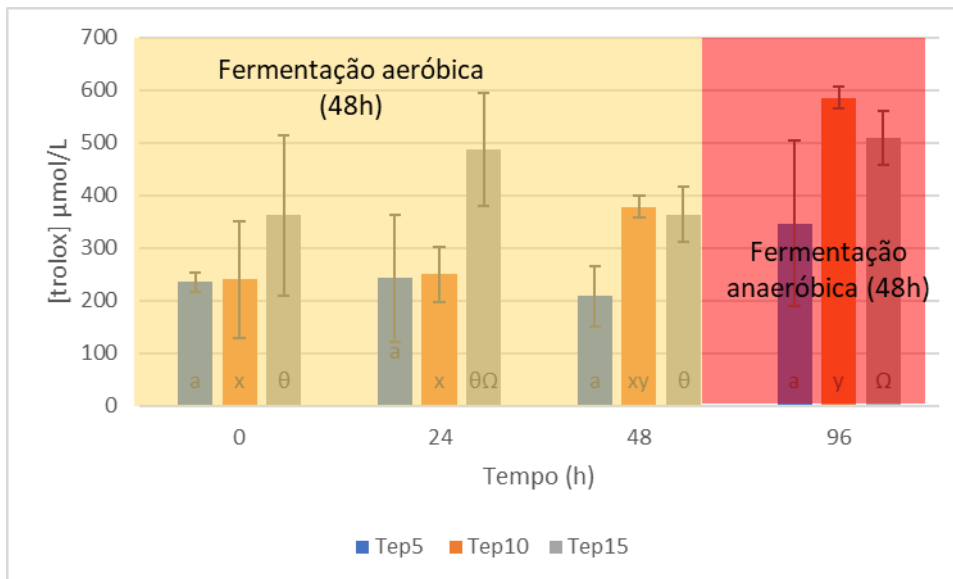


Figura 19 - Influência do tempo de fermentação com a evolução da atividade antioxidante obtida pelo método DPPH *letras ou símbolos diferentes indicam diferença significativa entre valores ($p < 0.05$)

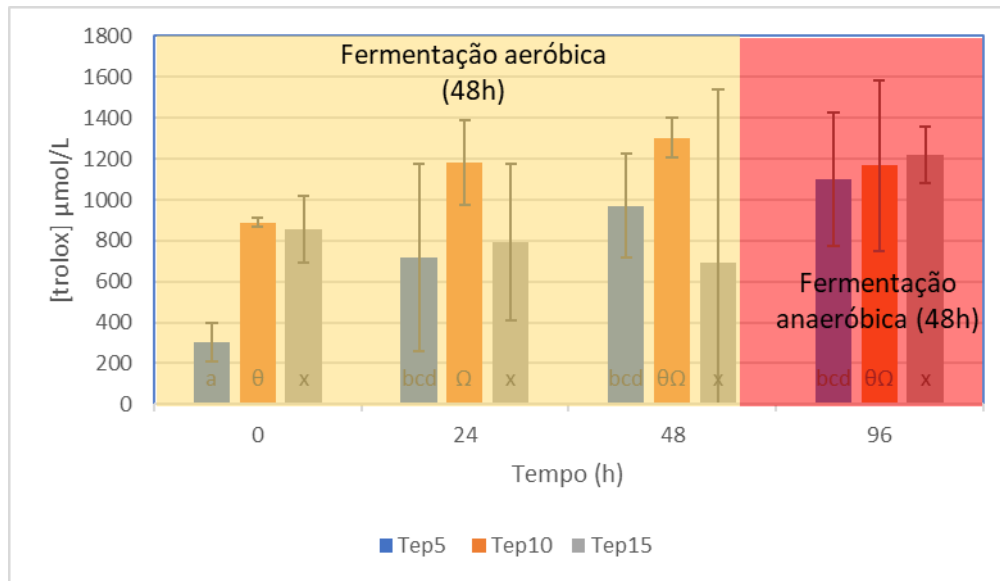


Figura 20 - A atividade antioxidante ao longo do processo de produção de Tepache, obtida pelo método FRAP *letras ou símbolos diferentes indicam diferença significativa entre valores ($p < 0.05$)

Como é possível observar, as atividades antioxidantes das diferentes formulações, no final da fermentação, apresentaram valores superiores em relação aos valores do início da fermentação, muito embora no caso da formulação do Tepache 15% o aumento não foi linear. O aumento do potencial antioxidante poderá estar relacionado com a presença de bactérias lácticas, frequentemente descritas como tendo um papel importante na produção de metabolitos do grupo dos flavonóides e outros, com ação de sequestrador de espécies reativas de oxigénio. Estes resultados vão ao encontro dos resultados apresentados por Velázquez-Quiñones et al., (2021) que reporta o aumento de vários compostos com efeito antioxidante tais como o ácido protocatechuico, ácido clorogénico, catequinas entre outros, em bebidas fermentadas tipo Tepache à base de sumo de maçã.

4.7 Evolução de parâmetros relacionados com aspetos sensoriais dos Tepaches produzidos

4.7.1 Viscosidade

Estão apresentadas na Figura 21, Figura 22 e Figura 23 a variação dos valores da viscosidade (η) em função da velocidade de deformação aplicada às diferentes formulações do *Tepache*. As amostras foram analisadas em triplicado, de cada dia da fermentação da bebida calculando-se os valores médios.

Desenvolvimento de bebidas fermentadas a partir de subprodutos de ananás dos Açores

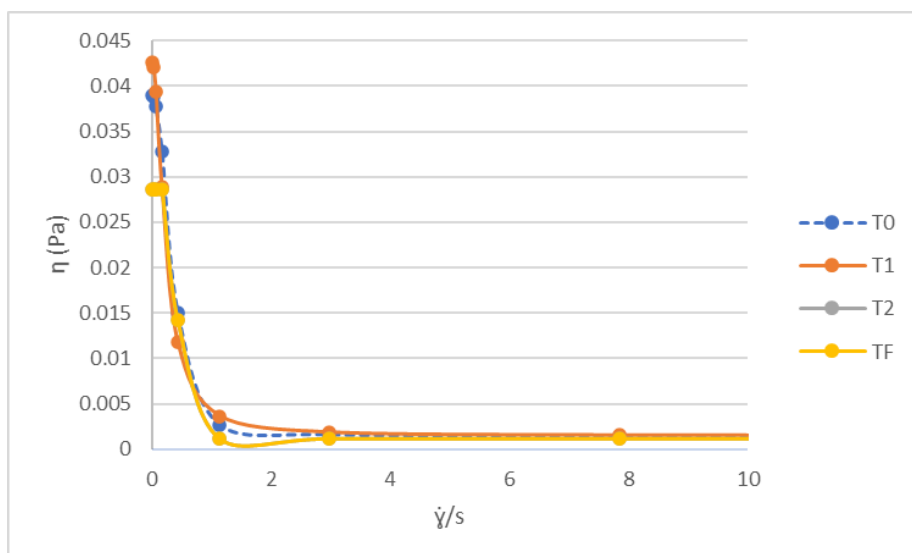


Figura 21 - Evolução da viscosidade com o aumento da velocidade de deformação no Tepache 5%

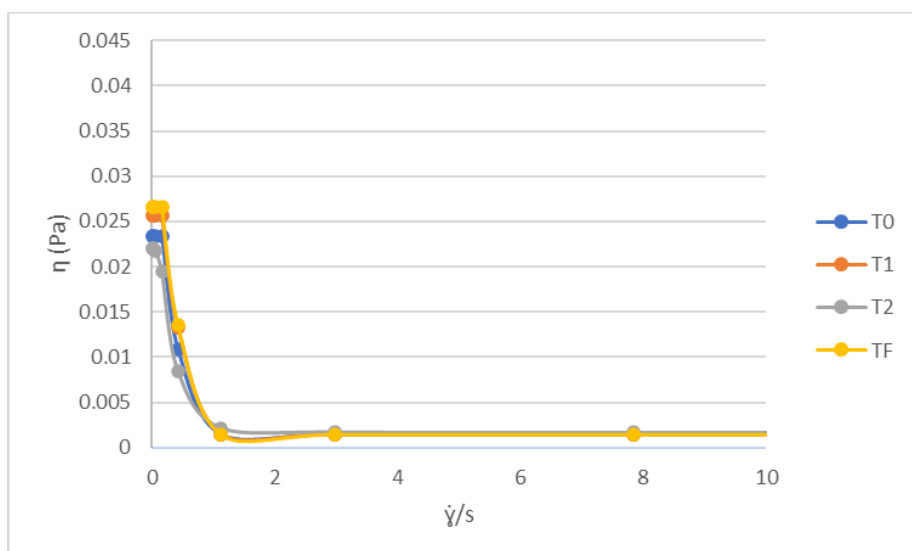


Figura 22 - Evolução da viscosidade com o aumento da velocidade de deformação no Tepache 10%

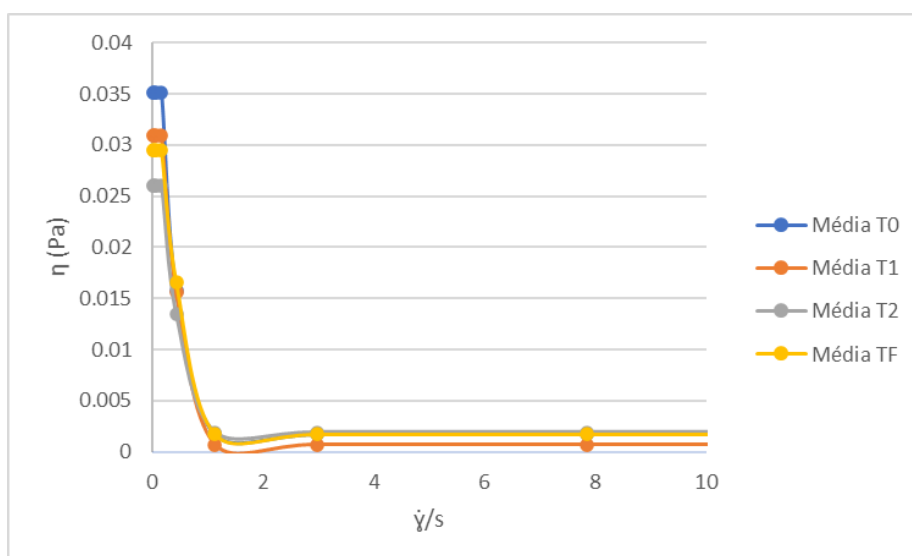


Figura 23 - Evolução da viscosidade com o aumento da velocidade de deformação no Tepache 15%

Como se pode verificar, em nenhuma das formulações usadas se observou alterações na viscosidade do *Tepache* com a variação da velocidade de deformação, o que indica que na bebida final não é possível estabelecer qualquer correlação entre estas variáveis.

4.7.2 Cor do Tepache

Para além da viscosidade determinou-se também a cor das bebidas uma vez que este é um dos parâmetros importantes que são apreciados pelo consumidor quando avalia uma bebida. Da Tabela 7 até à Tabela 9 estão apresentados os valores médios obtidos, e respetivos desvios padrões, no sistema CIELab das amostras de *Tepache*, recolhidas ao longo do processo fermentativo:

Tabela 7 – Valores do parâmetro L e das coordenadas cromáticas a* e b* do Tepache 5% ao longo do processo*

Tepache 5%						
Tempo (h)	L*	Desv.P	a*	Desv.P	b*	Desv.P
0	20,74	0,02	2,66	0,04	3,82	0,02
24	25,33	0,17	0,25	0,05	4,76	0,07
48	25,45	0,02	0,32	0,04	2,20	0,02
96	26,00	0,08	0,53	0,06	3,09	0,01

Tabela 8 - Valores do parâmetro L e das coordenadas cromáticas a* e b* do Tepache 10% ao longo do processo*

Tepache 10%						
Tempo (h)	L*	Desv.P	a*	Desv.P	b*	Desv.P
0	25,65	0,01	2,70	0,02	10,60	0,01
24	22,41	0,02	1,79	0,03	4,49	0,02
48	23,42	0,05	1,33	0,09	2,98	0,01
96	24,92	0,02	0,81	0,03	2,75	0,06

Tabela 9 - Valores do parâmetro L e das coordenadas cromáticas a* e b* do Tepache 15% ao longo do processo*

Tepache 15%						
Tempo (h)	L*	Desv.P	a*	Desv.P	b*	Desv.P
0	23,73	0,00	3,11	0,02	8,43	0,02
24	22,35	0,04	2,68	0,05	5,85	0,06
48	22,65	0,12	1,65	0,05	2,81	0,02
96	24,08	0,09	1,43	0,06	3,70	0,10

Para ver se a influência, em termos de produto final, da concentração inicial de açúcar em relação à cor do produto era significativa e perceptível ao olho humano, analisou-se a diferença entre os valores de cada coordenada (Figura 24).

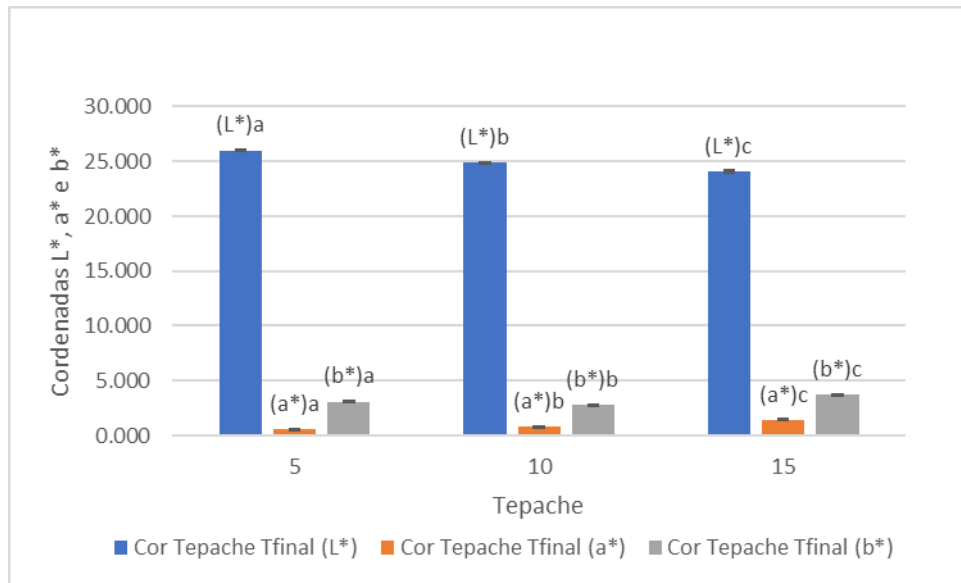


Figura 24 – Parâmetro L* e coordenadas cromáticas de cada formulação de Tepache *letras diferentes indicam diferença significativa entre valores ($p < 0.05$)

Da análise do gráfico é possível verificar que cada formulação deu origem a cores finais significativamente diferentes ($p < 0.05$), que vão ao encontro do que se havia verificado por observação direta da bebida, observando-se uma cor significativamente mais escura (menor valor de L*) no Tepache com o aumento da concentração inicial de açúcar, sendo este visualmente detetável como se pode observar na Figura 25, sendo esta observação coerente com os valores obtidos no parâmetro L*.



Figura 25 - Tepache 5% (A), Tepache 10% (B) e Tepache 15% (C)

Na Tabela 10, são apresentados os dados referentes à alteração dos parâmetros da cor, os quais indicam uma maior variação da cor para a formulação com 10% de concentração (p/v) em relação às restantes formulações, com uma grande diminuição nas coordenadas a* e b*. Em relação ao Tepache com 5 e 15%, o valor de ΔE não permite a detecção de diferenças de cor entre os dois Tepaches.

Tabela 10 - Variação dos parâmetros entre o início e final da fermentação do Tepache

Tempo de Fermentação	Parâmetro	Tep5	Tep10	Tep15
Inicial	L	20,74	25,65	23,73
	a*	2,66	2,70	3,11
	b*	3,82	10,60	8,43
Final	L	26,00	24,92	24,08
	a*	0,53	0,81	1,43
	b*	3,09	2,75	3,70
ΔE		5,73	8,10	5,03

4.8 Avaliação sensorial

Com a finalidade de avaliar o grau de aceitação das bebidas produzidas e selecionar aquela que era percebida pelo consumidor como a mais apelativa, realizaram-se provas de aceitação de consumidor.

Para a prova de análise sensorial às diferentes formulações foram questionados 33 provadores não-treinados, aos quais foi primeiramente perguntado sexo, idade e regularidade com que consumiam bebidas fermentadas.

Na Figura 26 e Figura 26 são apresentados os resultados dessas questões sobre o provador, verificando-se que este foi composto maioritariamente por indivíduos com idades compreendidas entre 21 e 30 anos e do sexo feminino.



Figura 26 - Sexo dos provadores

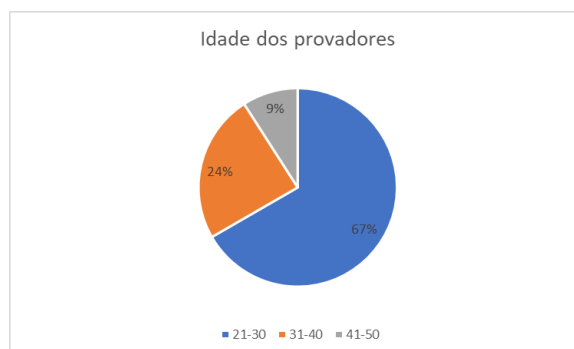


Figura 27 - Idade dos provadores

Desenvolvimento de bebidas fermentadas a partir de subprodutos de ananás dos Açores

Na folha de prova os provadores tinham que atribuir uma avaliação numa escala de 1 a 9 às características do produto (aspeto geral, cor, aroma e sabor), já a intenção de compra foi avaliada numa escala de 1 a 5. Após a recolha das fichas de prova foi feita a média das classificações de cada bebida para cada parâmetro avaliado, apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Classificações médias de cada formulação de Tepache da avaliação sensorial

	Tep 5%	Tep 10%	Tep 15%
Aparência geral	7,48	7,90	7,79
cor	7,52	7,86	7,66
Aroma	6,55	6,66	6,55
Sabor	6,34	7,69	7,86
Doce	5,66	7,41	7,24
Gaseificação	5,76	6,52	6,55

De modo geral, as classificações dadas pelos provadores às diferentes bebidas não se distanciaram muito, exceto no parâmetro “Doce”, mostrando a preferência pelas formulações mais doces, o que acabou por se refletir no parâmetro “intenção de compra”, como mostra a Figura 28.

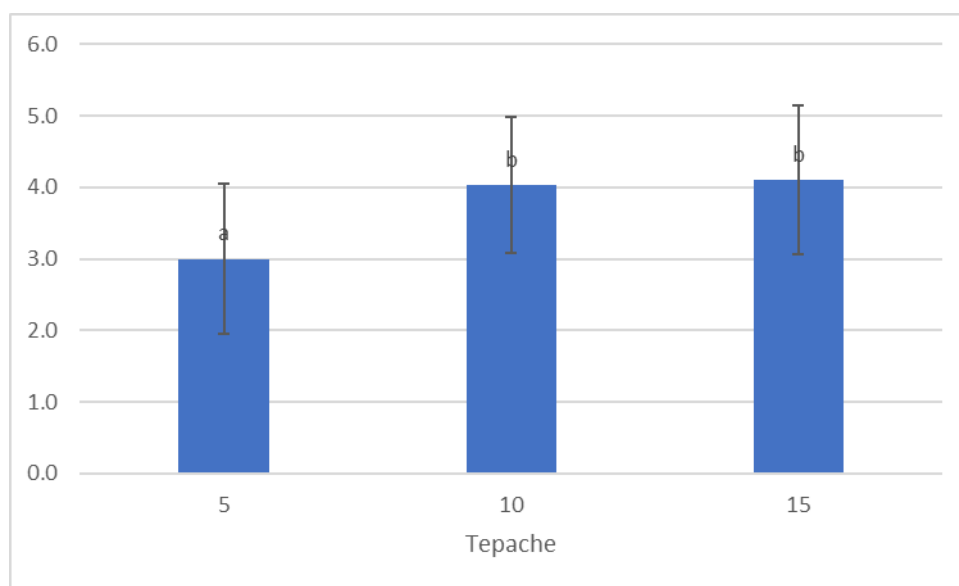


Figura 28 - Intenção de compra por parte dos provadores para cada formulação de Tepache *letras diferentes indicam a existência de diferença significativa

Tabela 12 - Intenção de comprar para cada formulação de Tepache

	Tep 5%	Tep 10%	Tep 15%
Intenção de compra	3,00	4,03	4,10
Desv.Padrão	1,05	0,94	1,04

Na Figura 29 é apresentado um diagrama com as médias das avaliações de todos os parâmetros avaliados pelos consumidores.

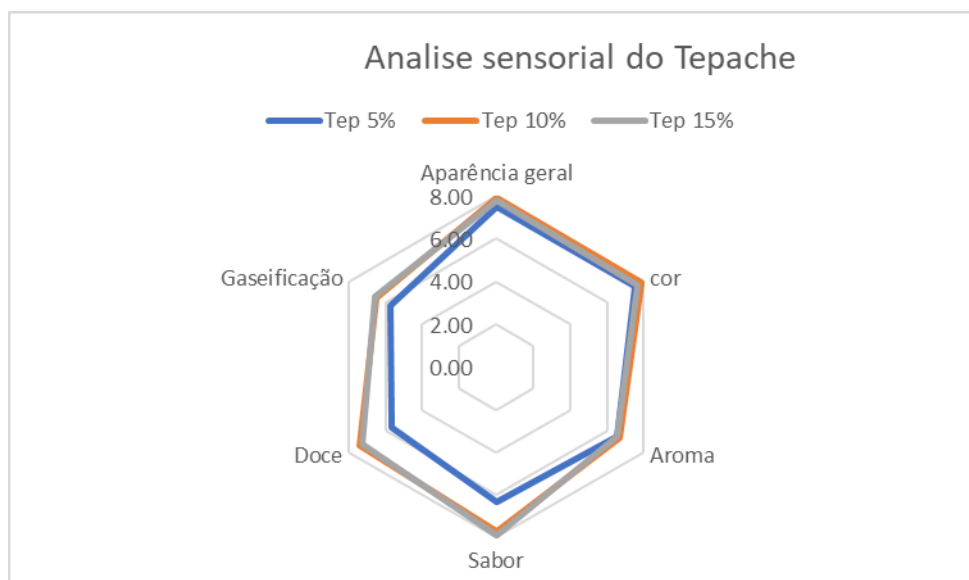


Figura 29 – Médias dos resultados obtidos para a análise sensorial do Tepache

Em suma, podemos inferir que ambas as formulações com 10% e 15% de concentração de açúcar inicial foram as que obtiveram melhor aceitação, sem se diferenciarem significativamente ($p < 0.05$). Foi apontado por alguns provadores, como defeitos, características naturais das bebidas como “aroma a fermentado” e demasiada acidez, que pode ter resultado do facto de grande parte dos provadores não ser consumidor habitual de bebidas fermentadas, mas que mesmo assim não deixou de ser apreciado pela positiva por consumidores habituais ou que conheçam este tipo de produtos.

B. Vinagre a partir de mosto de ananás DOP dos Açores

O vinagre é produzido a partir do mosto de frutas, o qual passa por duas fermentações distintas. Primeiramente há uma fermentação alcoólica, por ação das leveduras que consomem os açúcares do mosto, e de seguida é feita a acetificação por ação de bactérias acéticas aeróbias (Tessaro et al., 2010).

Esta parte do trabalho, teve como objetivo produzir um vinagre a partir do mosto do ananás obtido pela trituração do fruto inteiro. Tal como na bebida anterior, com vista o aproveitamento de todas as componentes do fruto, foi desenvolvido um processo de produção de um vinagre de ananás, cuja matéria-prima usada foi o sumo do ananás dos Açores.

Foram usados três métodos diferentes, ambos com a utilização de inóculos, sendo usado no primeiro vinagre (Vinagre S) uma inoculação inicial com uma levedura *S.cerevisiae* em que após as 48h de fermentação foi adicionada uma “mãe de Kombucha”,

um segundo vinagre (Vinagre K) foi apenas usada a “mãe de Kombucha” e um terceiro vinagre (Vinagre KS) foi inoculado inicialmente com a levedura e “mãe de Kombucha” em simultâneo.

De modo a tentar melhorar o processo fermentativo, foi ainda avaliada a evolução dos vinagres com a incorporação forçada de oxigénio, tendo-se usado uma bomba de aquário com um filtro para forçar o arejamento da bebida. Para esta parte da experiência foram apenas selecionados os vinagres (S e K) que se destacaram pela positiva por se aproximar das características esperadas de um vinagre de fruta.

4.9 Evolução do pH e da acidez

Foi analisada a evolução do pH e da acidez do vinagre ao longo do tempo de fermentação, tendo sido a evolução de ambos o parâmetro coerente entre si, tal como é possível observar nas figuras, tivemos um aumento da acidez com a diminuição do pH (Figura 30, Figura 31, Figura 32).

Em todas as formulações o pH foi sempre inferior a 4 e a acidez final foi sempre superior no final do tempo de produção em comparação com a inicial. No entanto os valores de acidez total ficaram abaixo dos valores estipulados por lei para o vinagre (**Decreto-Lei n.º 174/2007 de 08 de maio**)

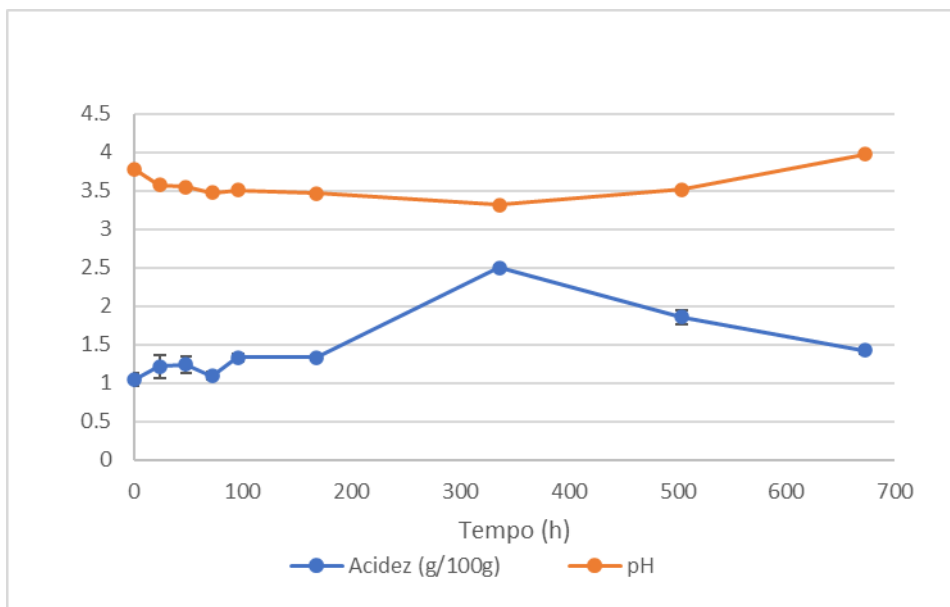


Figura 30 - Evolução do pH e acidez total no Vinagre S ao longo da sua produção

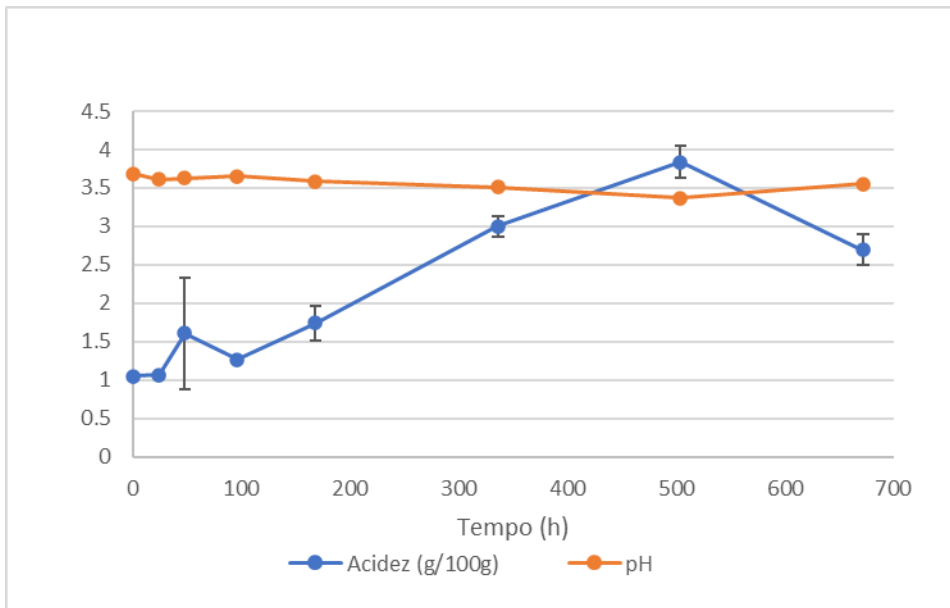


Figura 31 - Evolução do pH e acidez total no Vinagre K ao longo da sua produção

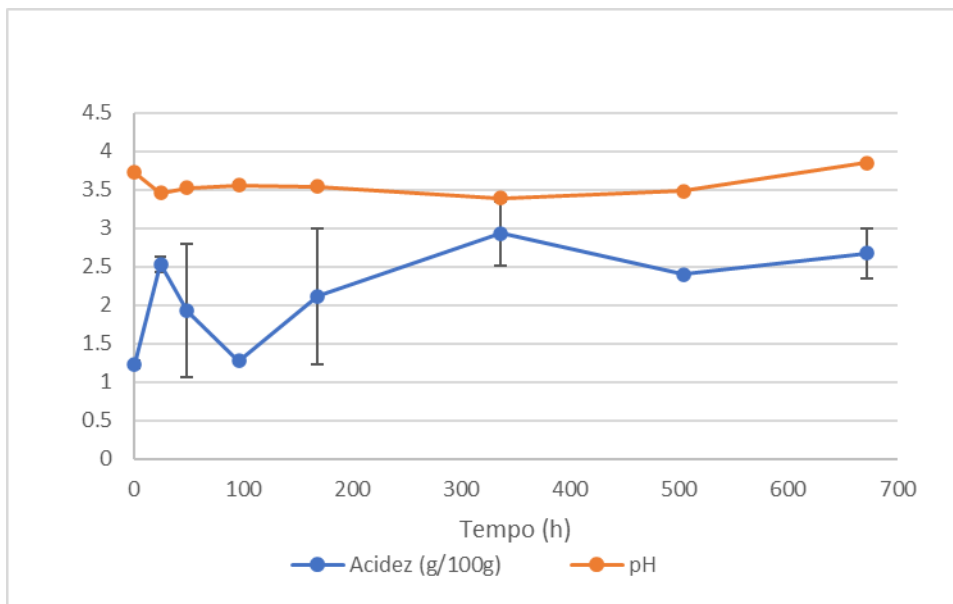


Figura 32 - Evolução do pH e acidez total no Vinagre KS ao longo da sua produção

4.10 Evolução do °Brix

Tendo sido o vinagre feito com mosto de ananás, é importante analisar a evolução do parâmetro °Brix, de modo a poder concluir a evolução dos sólidos solúveis presentes na bebida ao longo da fermentação. Segundo a bibliografia, a conversão dos açúcares em etanol, no caso do inóculo com *Saccharomyces cerevisiae*, ocorre nas 48h da fermentação alcoólica, sendo neste período o maior decréscimo do total de sólidos solúveis (Tessaro et al., 2010), o que também se verificou neste trabalho, não só na formulação com o inóculo do starter (vinagre S), mas também nas restantes com apenas a Mãe de Kombucha (vinagre K) e o consorcio entre Starter e Scoby (vinagre KS) (Figura 33) .

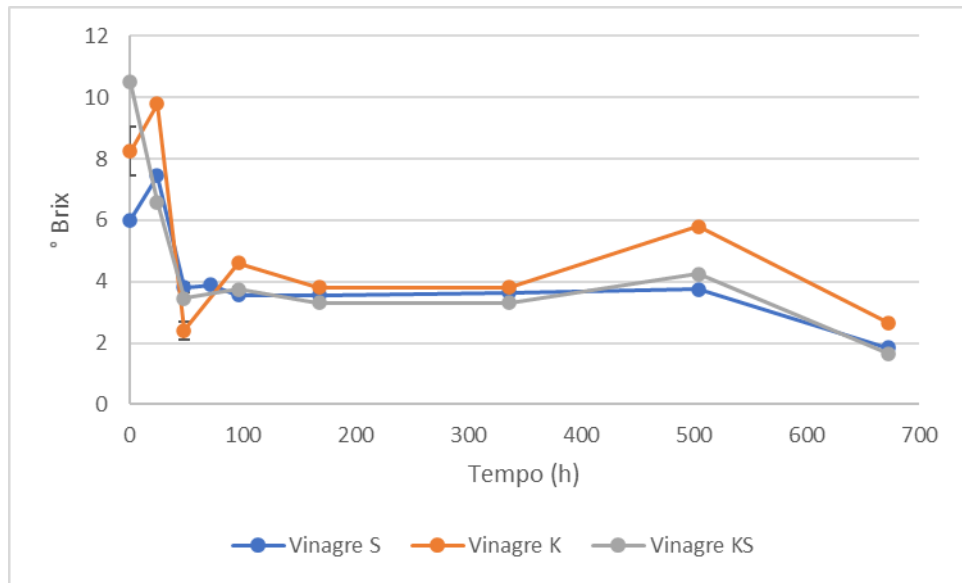


Figura 33 - Evolução do °Brix ao longo do tempo de fermentação em cada método de produção de vinagre

Em todos os casos houve a redução dos sólidos solúveis totais para valores inferiores a 4 nas primeiras 48h, em ambos os métodos de produção do vinagre. Mesmo sem a cultura starter verificou-se uma eficiência no consumo do substrato disponível no vinagre K e vinagre KS e mesmo em termos de produto final, acabamos com valores muito idênticos sendo que o único que se diferenciou significativamente foi o vinagre K dos restantes, tal como possível de se observar na Figura 34:

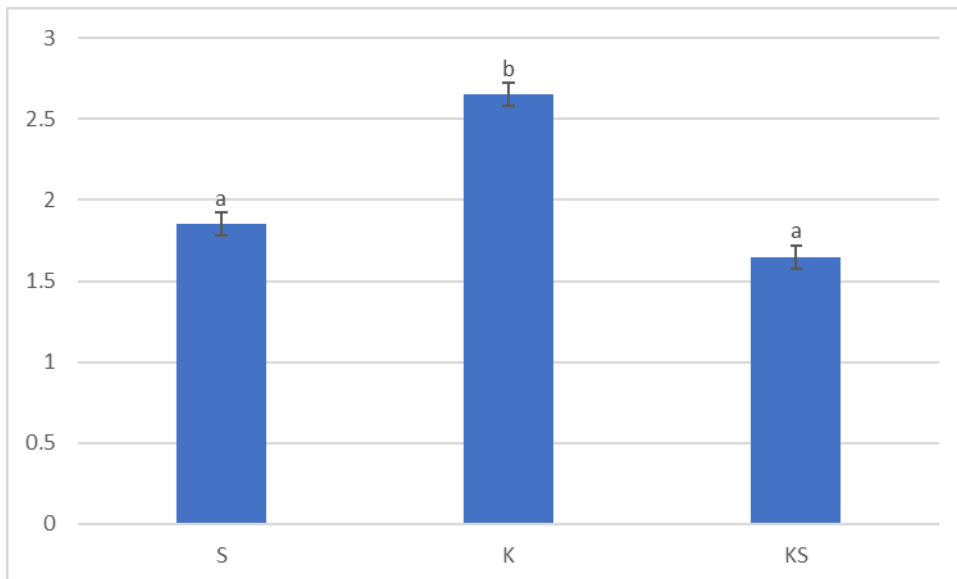


Figura 34 - ANOVA do °Brix no vinagre final de cada método de produção *letras diferentes indicam a existência de diferença significativa ($p < 0.05$)

4.11 Evolução da microbiota ao longo do processo de produção de vinagre

Em termos de contagens totais de leveduras, verificou-se que na primeira semana de fermentação o total de leveduras era de 10^7 UFC/ml, na segunda semana os valores reduziram para valores considerados incontáveis (< 15 UFC por placa) para o método do vinagre feito apenas com a kombucha, o vinagre K. As leveduras dominantes, identificadas por método PCR e cuja presença ao longo da fermentação foi mais regular, foram a *Hanseniaspora uvarum* e a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo esta última apenas detetada no produto final dos métodos do vinagre S e vinagre KS, nos quais esta levedura foi inoculada no início da produção.

Em relação às bactérias acéticas, foram feitas as contagens de 103 UFC/ml durante as primeiras 24h e em termos de produto final acabamos com valores de 106 UFC/ml de bactérias acéticas totais.

4.12 Evolução da concentração de açúcar nos diferentes métodos de produção do vinagre com a metabolização dos açúcares livres, produção de álcool e ácidos

4.12.1 Utilização dos açúcares

Durante a fermentação alcoólica do mosto o principal substrato utilizado pelos microrganismos são os açúcares livres, como a glucose e frutose, que vão ser metabolizados e vão dar origem ao álcool que depois é convertido em ácido durante a fermentação acética.

Na Figura 35 conseguimos observar a concentração de açúcares livres presentes no mosto recolhido ao longo da produção de cada um dos vinagres:

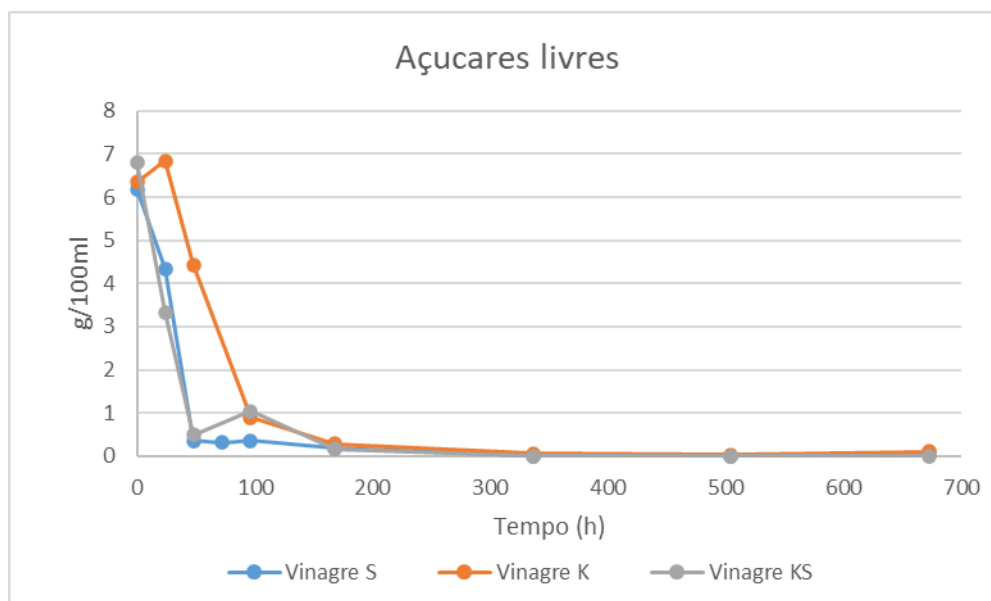


Figura 35 - Consumo de substrato ao longo do tempo de produção de cada vinagre

Através do HPLC analisamos o consumo deste substrato e verificamos um consumo mais eficiente no vinagre S e vinagre KS, estando relacionado com o facto de a inoculação com a levedura *S. cerevisiae* garantir que temos uma predominância desta levedura responsável pela produção de álcool através do consumo de açúcar.

4.12.2 Produção de álcool e ácido acético

Como é visível na Figura 36, o uso de uma cultura de arranque favoreceu a produção de álcool concomitante com o maior consumo de açúcar por parte da levedura inoculada, que em 48h consumiu quase a totalidade do açúcar, o que por sua vez leva a uma maior produção de ácido pelas bactérias acéticas.

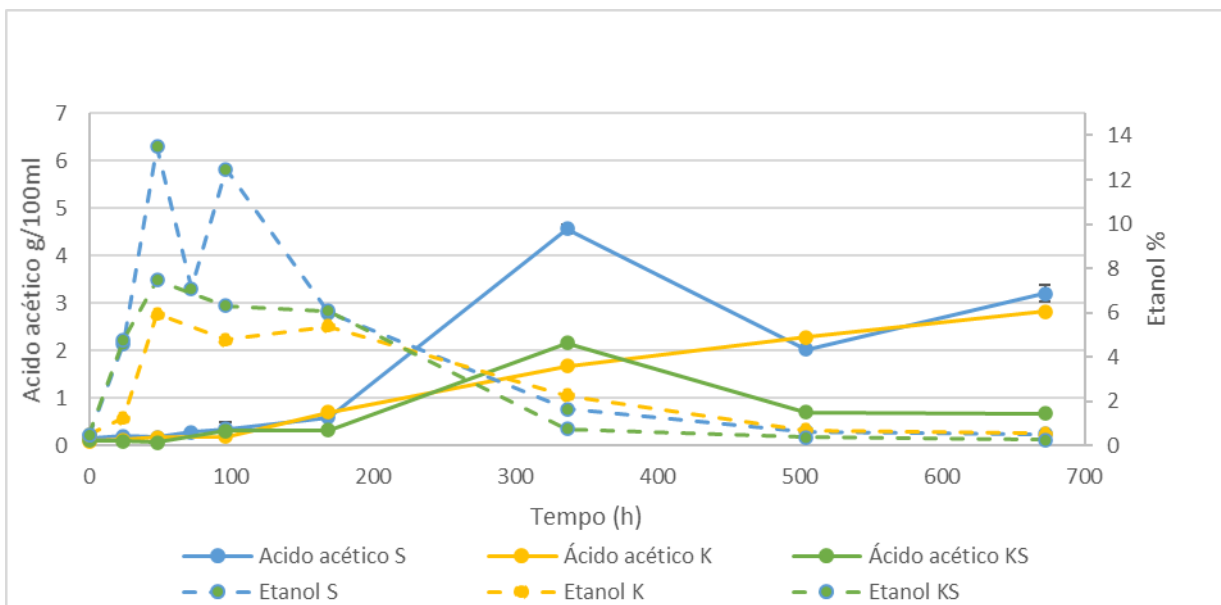


Figura 36 - Evolução da concentração de ácido acético e de etanol ao longo da produção dos vinagres

Em termos de produto final, obtivemos produtos com pouco álcool em ambos os métodos, no entanto, foi no vinagre S e vinagre K que obtivemos maior produção de ácido acético, sendo estes o que demonstraram melhor eficiência na fermentação acética e sensorialmente também foram estes os que tinham qualidades sensoriais mais próximas dos vinagres comerciais.

4.13 Influência no arejamento forçado na produção do vinagre

Dado que um mês não foi suficiente para a bebida atingir os valores de referência para ser considerada um vinagre de fruta, que segundo o Decreto-Lei nº 174/2007 de 8 de maio, teria que ter valores mínimos de acidez total de 5g/100 mL expresso em ácido acético e álcool máximo de 0.5%, foi feito um segundo ensaio com um sistema de arejamento forçado com uma bomba de aquário para tentar melhorar e avaliar a eficiência do método, para tal foram recolhidas amostras para medição dos valores de pH, acidez total e de °Brix.

Esta técnica de arejamento, também conhecida como processo submerso, é o mais utilizado industrialmente na produção de vinagre devido ao facto de assegurando um arejamento intenso e a disponibilização de oxigénio é previsto um aumento no rendimento de acidificação entre os 5 e 8%, além de ser possível automatizar e utilizar recipientes de fermentação menores (Stepmann et al., 2015).

Nas Figura 37 até à Figura 39 é possível observar a evolução dos vinagres escolhidos, os quais que sensorialmente foram considerados mais agradáveis e mais próximos do objetivo final que se pretendia para este produto, em comparação à sua versão com arejamento forçado, (dado o tempo disponível apenas foram obtidos dados durante a primeira semana de fermentação).

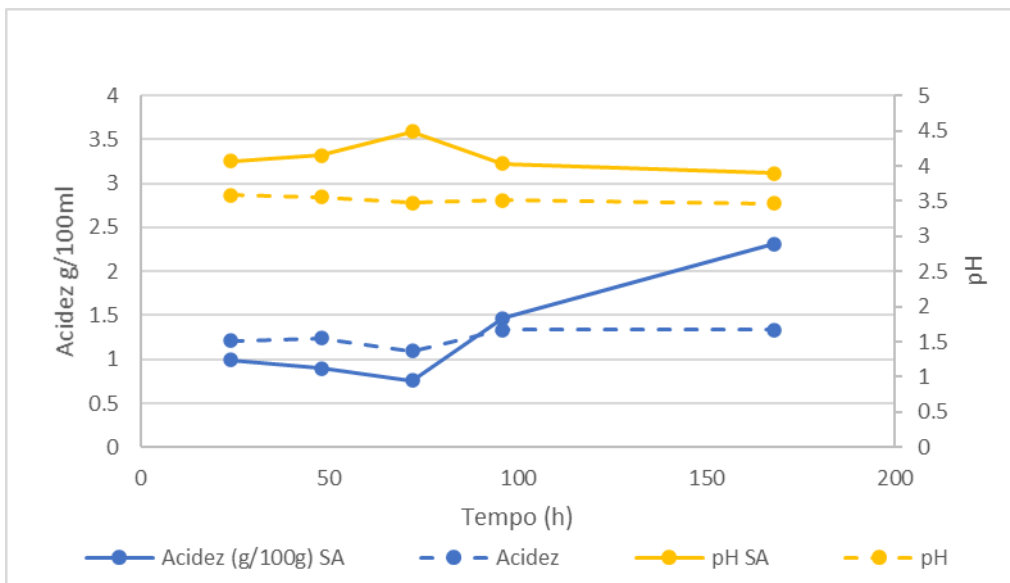


Figura 38 - Influência na evolução físico-química do vinagre ao aplicar o arejamento forçado (SA)

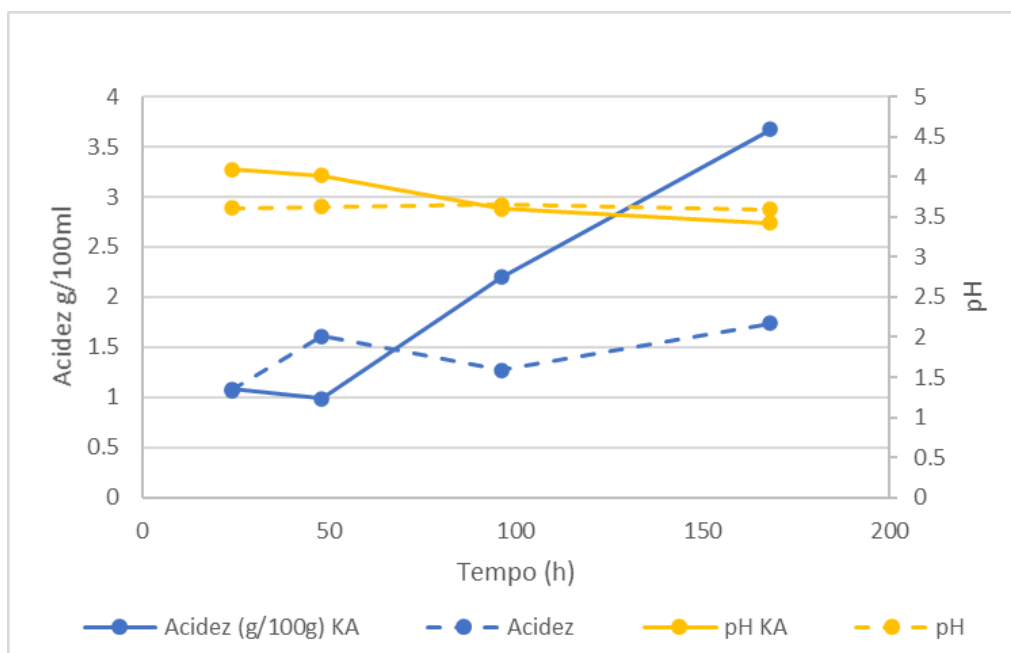


Figura 37 - Influência na evolução físico-química do vinagre ao aplicar o arejamento forçado (KA)

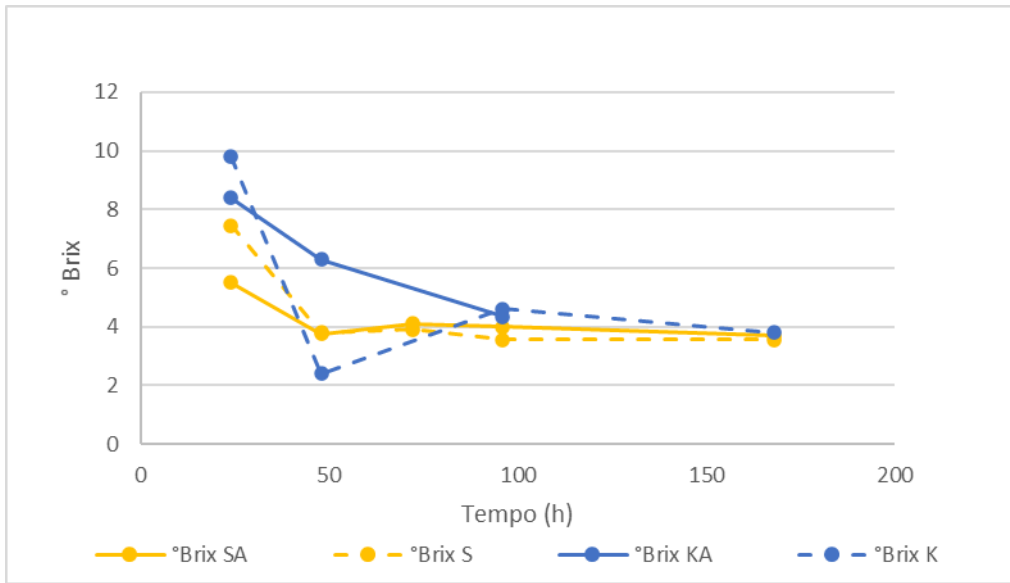


Figura 39 - Evolução do °Brix ao longo do tempo de fermentação

Ao utilizar o arejamento forçado não se verificou grandes alterações em termos de pH nem de °Brix, no entanto conseguimos observar que ao oxigenar a bebida conseguimos uma maior acidez, sendo aqui onde se deteta maior influência deste método nas qualidades químicas deste produto.

5 Conclusões e perspectivas futuras

No presente trabalho foram desenvolvidas duas bebidas visando o aproveitamento de todas as componentes do ananás, mais concretamente de ananás DOP dos Açores. O processo de produção desta bebida foi caracterizado, analisando-se a evolução das bebidas ao longo da produção e avaliando-se a sua eficiência tecnológica e propriedades sensoriais. Foram elaboradas três formulações de uma bebida produzida com base no processo tradicional de produção de *Tepache* e três formulações de vinagre, sendo que, no caso desta última bebida foi avaliado também o efeito do arejamento forçado na melhoria de eficiência na sua produção.

Em relação ao *Tepache*, podemos concluir que em termos sensoriais as formulações destacadas foram as produzidas com 10 e 15% de açúcar inicial, No entanto, tecnologicamente a concentração com 10% de açúcar inicial será a escolha preferencial dada a sua maior eficiência em termos de utilização do substrato pela microbiota presente durante a fermentação..

Em relação à síntese de metabolitos, a evolução de ambas as formulações tenderam para as mesmas concentrações de etanol e de ácido acético, concomitante com a redução observada dos açúcares livres (glucose e frutose) em resultado da fermentação alcoólica. Apesar de, ao longo da produção das bebidas, a evolução destes metabolitos apresentar diferenças, as suas características finais foram aproximadamente idênticas.

Sensorialmente, a bebida que mais se diferenciou (mas pela negativa) foi bebida produzida com 5% de açúcar adicionado, pelo sabor mais amargo, que por sua vez evidenciava mais o ácido presente. Pelo contrário, as bebidas com 10% e 15%, apresentaram um sabor mais doce que contrastava com a acidez, tendo sido este aspecto considerado positivamente e posteriormente refletido na avaliação sensorial das mesmas que apresentaram melhor pontuação que a formulação com 5% de açúcar adicionado. Na seguinte Tabela 13 são apresentados os valores mais relevantes para a caracterização de cada bebida.

Tabela 13 - Valores resumo das formulações da bebida *Tepache*

Tepache	Temperatura (°C)	Concentração inicial (%)	pH	Primeira fermentação (h)	Segunda Fermentação (h)	Intenção de compra (1-5)	Etanol (g/100mL)	Acido acético (g/100mL)	Glucose (g/100mL)	Frutose (g/100mL)
Tep5%	25	5	3,655	48	48	3	4,48	0,3	3,31	1,01
Tep10%	25	10	3,72	48	48	4,03	5,29	0,32	6,17	3,58
Tep15%	25	15	3,67	48	48	4,1	5,19	0,34	9,94	5,95

Nestas bebidas foram identificadas as espécies de levedura *Hanseniaspora opuntiae* e *Meyerozyma carribbica* como as principais espécies presentes naturalmente nas cascas

dos ananases usados e que já haviam sido identificadas por outros autores em bebidas feitas com os mesmos substratos (Moreno Terrazas Casildo, 2005; Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020). As estirpes isoladas poderão futuramente vir a ser usadas como culturas starter em processos de fermentação controlados e padronizados, sendo por isso de interesse o estudo da contribuição individual destas estirpes para o perfil fermentativo das bebidas. Para além disso, será igualmente necessário, identificar as espécies de bactérias lácticas e de bactérias acéticas presentes e realizar também uma caracterização similar.

Em termos de produção de álcool durante a fermentação alcoólica, as bebidas obtidas neste trabalho apresentaram um teor de álcool superior aos valores esperados (<1%) (Robledo-Márquez et al., 2021), o que pode ser explicado pelas diferentes condições edafoclimáticas e técnicas de produção do fruto. Futuramente, seria interessante estudar as condições de produção ótimas que permitam utilizar da melhor forma o potencial fermentativo das leveduras naturais das cascas, e comparar com as estirpes usadas nas versões industrializadas da bebida, inoculadas com *Saccharomyces cerevisiae*.

Os valores de ácido, ao contrário dos de etanol, foram muito baixos, sendo por isso necessário estudar e selecionar estirpes de bactérias ácido-lácticas necessárias para converter o etanol em ácido, algo característico da bebida.

Os estudos mais aprofundados das estirpes e processo permitirão no futuro a formulação de uma cultura starter mista, de leveduras e bactérias lácticas e acéticas, que poderá ser usado em processos mais controlados e facilitará o processo de produção da bebida.

No caso do estudo envolvendo a produção de vinagre, foram analisados três diferentes métodos de produção. Num primeiro caso, utilizou-se um método idêntico com o utilizado à escala industrial, inoculando com uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* que durante 48h consumiu os açúcares presentes no mosto e que os converteu em etanol (fermentação alcoólica), tendo posteriormente sido adicionada uma mãe de *Kombucha* (*Scooby*) que serviu de inóculo das bactérias acéticas (Vinagre S); noutra método foi apenas introduzido o *scooby* de uma *kombucha* muito ácida ao mosto de fruta (vinagre K); e por último foi feita a combinação do inóculo da levedura e do *scooby* em simultâneo no início da fermentação do mosto (vinagre KS).

Em termos tecnológicos foi possível conseguir um consumo quase total dos açúcares livres e um teor de etanol final reduzido, o que indica que todo o etanol sintetizado foi consumido, tendo sido convertido a ácidos orgânicos ou consumido para produção de energia (Tabela 14). Em termos sensoriais, a partir de uma avaliação preliminar realizada

Desenvolvimento de bebidas fermentadas a partir de subprodutos de ananás dos Açores

por parte das pessoas envolvidas no trabalho, destacaram-se o vinagre S e K como sendo aqueles que apresentaram um sabor e odor mais próximo do pretendido.

Tabela 14 - Valores resumo dos vinagres acabados

Vinagre	Temperatura (°C)	pH	Tempo de fermentação (dias)	Etanol inicial (g/100mL)	Ácido acético inicial (g/100mL)	Glucose inicial (g/100mL)	Frutose inicial (g/100mL)	Etanol (g/100mL)	Acido acético (g/100mL)	Glucose (g/100mL)	Frutose (g/100mL)
Vinagre S	25	3,98	28	0,46	0,15	3,2	2,98	0,54	3,21	0	0,05
Vinagre K	25	3,55	28	0,5	0,23	3,03	3,32	0,43	6,07	0,04	0,04
Vinagre KS	25	3,85	28	0,5	0,25	3,2	3,61	0,28	1,47	0	0

Em termos de acidez total, nenhum dos vinagres referidos anteriormente atingiu a acidez mínima exigida por lei para ser considerado um vinagre. tendo sido depois testado o efeito do arejamento forçado. Neste duplicado, devido a limitações de tempo, foi apenas analisada a evolução do pH, °Brix e acidez total durante uma semana tendo obtido valores favoráveis à hipótese de que o arejamento forçado possa conseguir encurtar o tempo de produção do vinagre. Seria assim interessante realizar um estudo mais aprofundado das condições de fermentação necessárias para produzir vinagre a partir de resíduos da produção de ananás DOP dos Açores.

Os resultados obtidos com o presente trabalho permitem afirmar que, em termos globais, foi possível obter produtos sensorialmente apelativos e com potencial para virem a ser introduzidos no mercado, contribuindo para a redução do desperdício alimentar dentro de uma óptica de economia circular, e acrescentando valor económico aos resíduos de uma indústria agro-alimentar de enorme relevância na Região Autónoma dos Açores.

6 Bibliografia

- Almeida, E. G. D. E. (2005). Identificação Dos Microorganismos Presentes Em Bebida Fermentada Produzida Pelos Índios Tapirapé. *Universidade Federal de Lavras - Programa de Pós- Graduação Em Microbiologia Agrícola*, 86.
- Aruna, T. E. (2019). Production of value-added product from pineapple peels using solid state fermentation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 57(January), 102193. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102193>
- Bortolini, F., Sebasti, E., & Torres, R. C. (2001). Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (actinidia deliciosa); composição dos mostos e métodos de fermentação acética 1. 21(2), 236–243.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Chu, C. Y., Vo, T. P., & Chen, T. H. (2020). A novel of biohythane gaseous fuel production from pineapple peel waste juice in two-stage of continuously stirred anaerobic bioreactors. *Fuel*, 279(June), 118526. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118526>
- Corona-González, R. I., Ramos-Ibarra, J. R., Gutiérrez-González, P., Pelayo-Ortiz, C., Guatemala- Morales, G. M., & Arriola-Guevara, E. (2013). The use of response surface methodology to evaluate the fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12, 19–28.
- Cruz, M. A. M. da. (2012). *Vinagres comercializados em Portugal: avaliação da capacidade antioxidante e da composição fenólica*. Escola Agraria do Instituto Politécnico de Viseu.
- Escobar-Ramírez, M. C., Jaimez-Ordaz, J., Escorza-Iglesias, V. A., Rodríguez-Serrano, G. M., Contreras-López, E., Ramírez-Godínez, J., Castañeda-Ovando, A., Morales-Estrada, A. I., Felix-Reyes, N., & González-Olivares, L. G. (2020). Lactobacillus pentosus ABHEAU-05: An in vitro digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage. *Revista Argentina de Microbiología*, xx. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.005>
- Filipa, A., & Henriques, F. (2014). *Análise de um Processo Fermentativo para Desenvolvimento de um Produto Alimentar*.
- Food Drink Europe. (2019). *Data & Trends, EU Food & Drink Industry*.
- Galimberti, A., Bruno, A., Agostinetto, G., Casiraghi, M., Guzzetti, L., & Labra, M. (2021).

Fermented food products in the era of globalization: tradition meets biotechnology innovations. *Current Opinion in Biotechnology*, 70, 36–41.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.10.006>

Granato, D., Branco, G. F., & Cruz, A. G. (2010). *Probiotic Dairy Products as Functional Foods*. 9(Ada 2009), 455–470. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>

Granato, D., & Masson, M. L. (2010). Cor instrumental e aceitação sensorial de emulsões à base de soja: Uma abordagem através da metodologia de superfície de resposta. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1090–1096. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000400039>

Innova Market Insights. (2021). *Top Ten Trends for 2021. November 2020*.

Kusznierewicz, B., Śmiechowska, A., Bartoszek, A., & Namieśnik, J. (2008). The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *Food Chemistry*, 108(3), 853–861. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.049>

Licandro, H., Ho, P. H., Nguyen, T. K. C., Petchkongkaew, A., Nguyen, H. Van, Chu-Ky, S., Nguyen, T. V. A., Lorn, D., & Waché, Y. (2020). How fermentation by lactic acid bacteria can address safety issues in legumes food products? *Food Control*, 110(October 2019), 106957. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106957>

Maria, S., & Silvério, J. (2014). *Novos Produtos de Hortofrutícolas Fermentados Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar*.

Mintel. (2021). *Trends 2021 - Setor Agroalimentar*.

Mohankumar, J. B., Uthira, L., & SU, M. (2018). Total phenolic content of organic and conventional green leafy vegetables. *Journal of Nutrition and Human Health*, 02(01). <https://doi.org/10.35841/nutrition-human-health.2.1.1-6>

Mohd Ali, M., Hashim, N., Abd Aziz, S., & Lasekan, O. (2020). Pineapple (Ananas comosus): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. *Food Research International*, 137(July), 109675. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109675>

Moreno Terrazas Casildo, R. D. (2005). *Determinacion de las caraterísticas microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales para la estandarización del proceso de elaboración de Tepache.pdf*. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/1968>

Pérez-Armendáriz, B., & Cardoso-Ugarte, G. A. (2020a). Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food Research*

International, 136(May), 109307. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>

Pérez-Armendáriz, B., & Cardoso-Ugarte, G. A. (2020b). Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food Research International*, 136(March), 109307. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>

Pérez-jiménez, J. (2007). *Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre*. 0–3.

Robledo-Márquez, K., Ramírez, V., González-Córdova, A. F., Ramírez-Rodríguez, Y., García-Ortega, L., & Trujillo, J. (2021). Research opportunities: Traditional fermented beverages in Mexico. Cultural, microbiological, chemical, and functional aspects. *Food Research International*, 147(February). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110482>

Rodríguez-González, E. M. (2010). *Identificación de levaduras aisladas de tepache casero y comercial*. 45100.

Román-camacho, J. J., Santos-dueñas, I. M., García-garcía, I., Moreno-garcía, J., García-martínez, T., & Mauricio, J. C. (2020). International Journal of Food Microbiology Metaproteomics of microbiota involved in submerged culture production of alcohol wine vinegar : A first approach. *International Journal of Food Microbiology*, 333(July), 108797. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108797>

Romero-luna, H. E., Hernández-sánchez, H., & Dávila-ortiz, G. (2017). *Traditional fermented beverages from Mexico as a potential probiotic source*. 577–586. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1290-2>

Rufino, M. do S. M., Alves, R. E., Brito, E. S. de, Morais, S. M. de, Sampaio, C. de G., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2006). FRAP embrapa. *Comunicado Técnico*, 125 Embrapa, 3–6.

Simões, S., Santos, R., Bento-Silva, A., Santos, M. V., Mota, M., Duarte, N., Sousa, I., Raymundo, A., & Prista, C. (2021). Improving nutritional quality of unripe tomato through fermentation by a consortium of yeast and lactic acid bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, July. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11476>

Stepmann, F. B., Canan, C., & Colla, E. (2015). *Revisão Process and Substrates for the Vinegar Production* : a. 12–22.

Terra, V. R., & Leite, S. Q. M. (2017). Estudos culturais sobre a produção de vinagre para articular saberes escolares , científicos e populares : uma educação química com enfoque CTS / CTSA Cultural studies about vinegar production to articulate scholarly , scientific and popular knowledge : a. *Anais Do XI Encontro Nacional de Pesquisa Em Educação Em Ciências*, 1–10.

- Tessaro, D., Larsen, A. C., Dallago, R. C., Damasceno, S. G., Sene, L., & Coelho, S. R. M. (2010). Avaliação das fermentações alcoólica e acética para produção de vinagre a partir de suco de laranja. *Acta Scientiarum - Technology*, 32(2), 201–205. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v32i2.4275>
- Upadhyay, A., Laing, T., Kumar, V., & Dora, M. (2021). Exploring barriers and drivers to the implementation of circular economy practices in the mining industry. *Resources Policy*, 72(February 2020), 102037. <https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2021.102037>
- Velázquez-Quiñones, S. E., Moreno-Jiménez, M. R., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Álvarez, S. A., Rosales-Villarreal, M. C., Cervantes-Cardoza, V., & Rocha-Guzmán, N. E. (2021). Apple Tepache fermented with tibicos: Changes in chemical profiles, antioxidant activity and inhibition of digestive enzymes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(7), 1–15. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15597>
- Veloso, C. L. (2013). *Sistema de produção de vinagre*.
- Xiang, H., Sun-waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., & Cui, C. (2019). *Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective*.
- Zziwa, A., Jjagwe, J., Kizito, S., Kabenge, I., Komakech, A. J., & Kayondo, H. (2021). Nutrient recovery from pineapple waste through controlled batch and continuous vermicomposting systems. *Journal of Environmental Management*, 279(November 2020), 111784. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111784>

7 Anexos

Anexo I.

Retas de calibração utilizadas para a determinação da capacidade antioxidante e fenóis totais

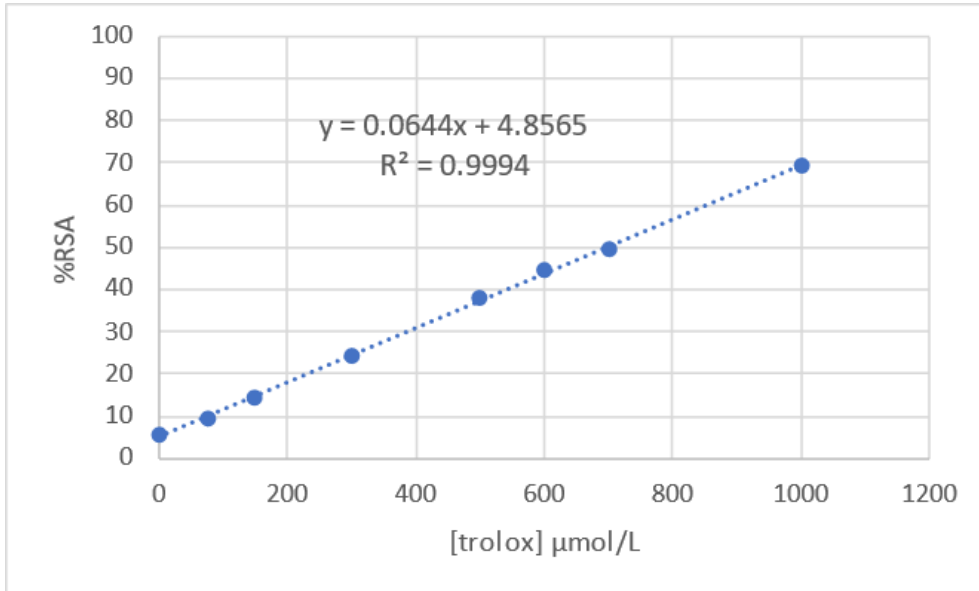


Figura 40 - Reta de calibração utilizadas para a determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH

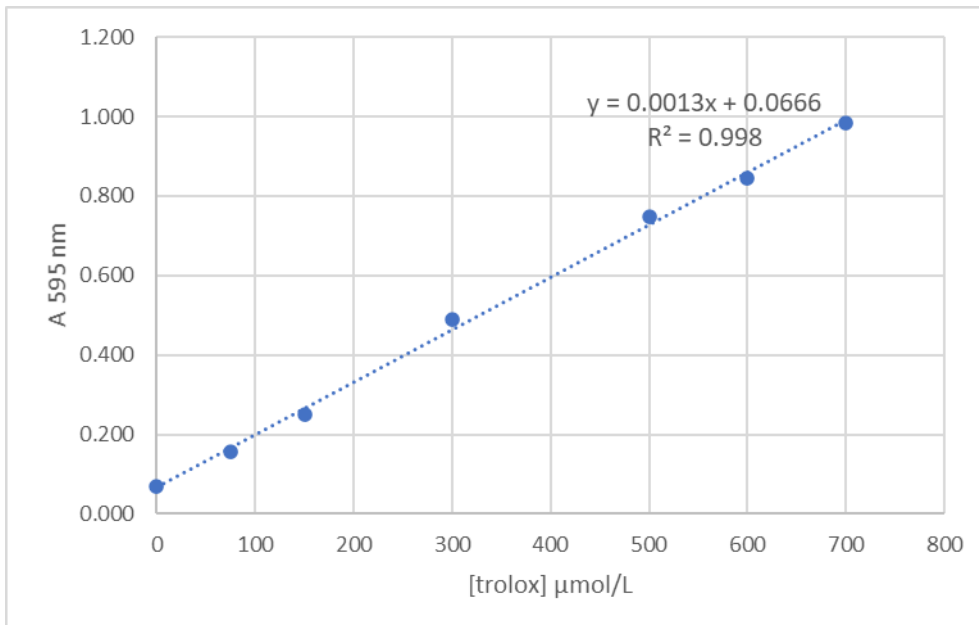


Figura 41 - Reta de calibração utilizadas para a determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP

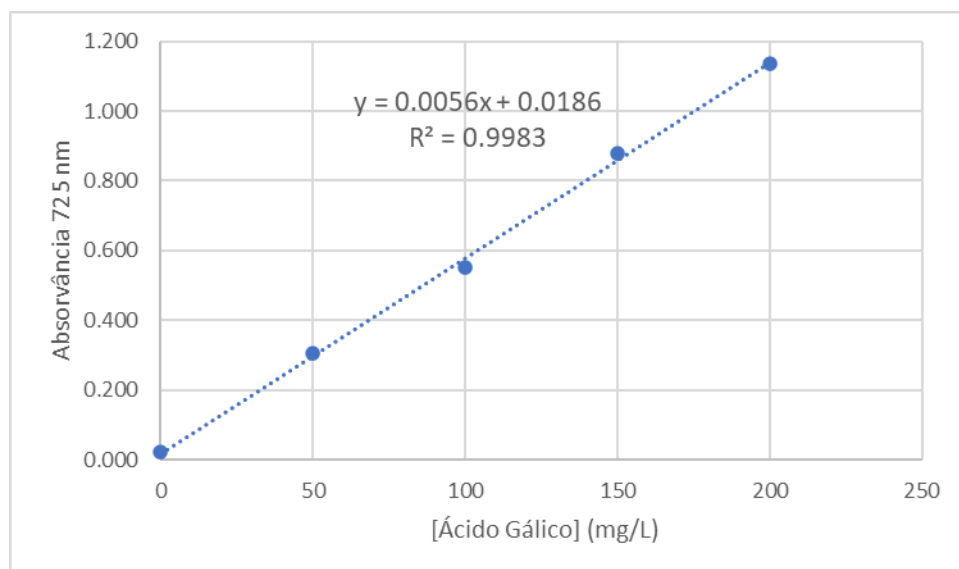


Figura 42 - Reta de calibração utilizadas para a determinação da concentração de compostos fenólicos totais

Anexo II.

Retas de calibração utilizadas para determinação da concentração de metabolitos nas bebidas por HPLC.

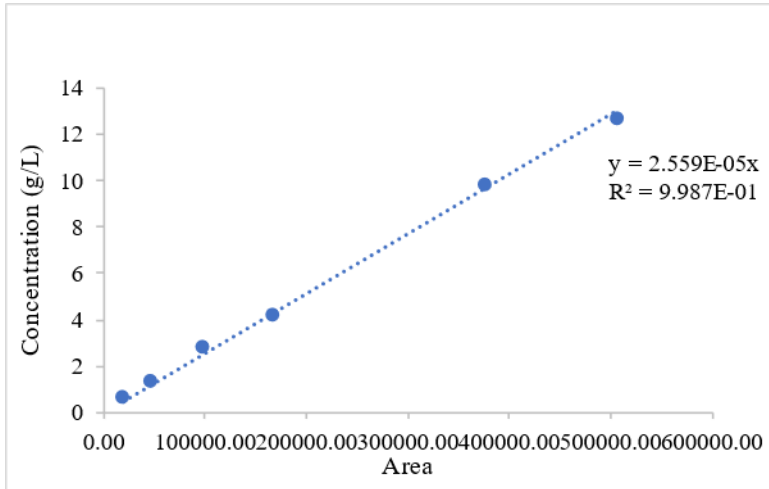


Figura 43 - Reta de calibração para a concentração de ácido acético

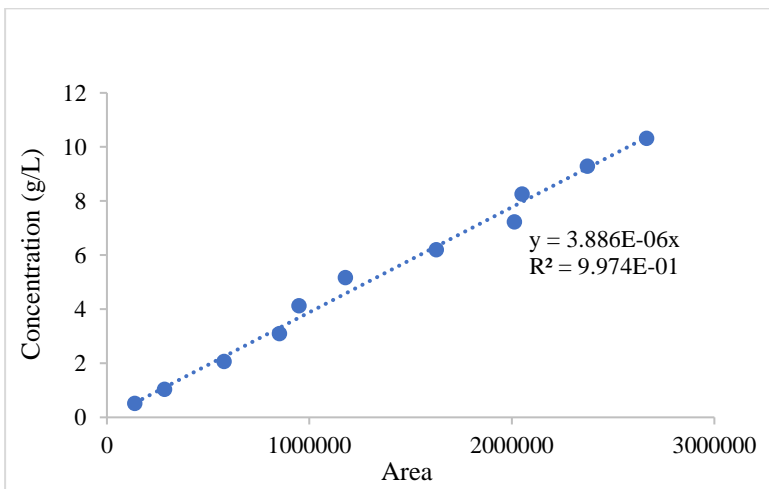


Figura 44 - Reta de calibração para a concentração de ácido láctico

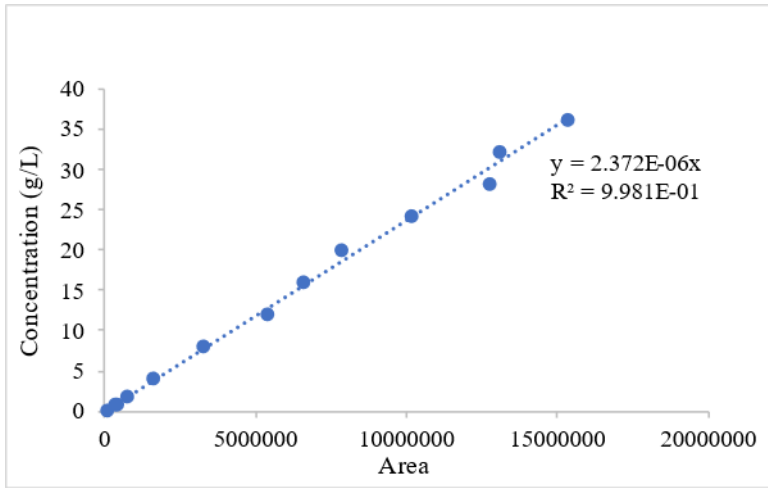


Figura 45 - Retas de calibração para a concentração de glicose

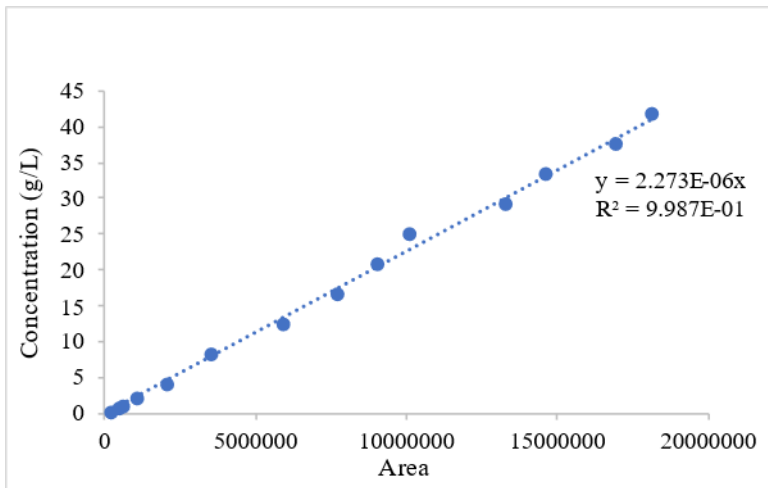


Figura 46 - Retas de calibração para a concentração de Frutose

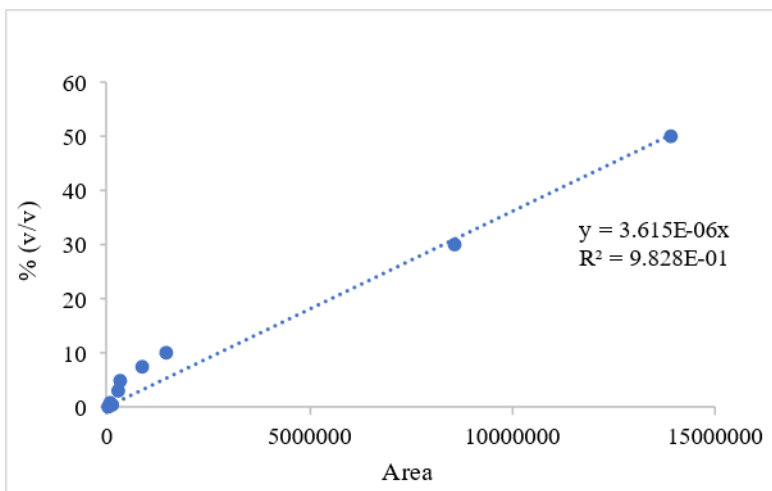


Figura 47 - Retas de calibração para a concentração de Etanol

Anexo III.

Bandas de ADN em gel de agarose obtidas por eletroforese



Figura 48 – Bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose do ADN amplificado das leveduras isoladas. Nos extremos encontra-se o padrão de peso molecular DNA Ladder I (NZYTech).

Anexo IV.

Ficha de prova sensorial

Ficha de prova

Nesta prova serão dadas a provar três formulações de *Tepache*, uma bebida refrescante de ananás dos Açores. Os dados recolhidos nesta prova terão a finalidade de avaliar a aceitabilidade da bebida por parte do consumidor. **A análise é individual e independente para todas as amostras.**

Nome: _____ Idade: _____

Sexo: () Masculino () Feminino

Ocupação: _____

Consome bebidas fermentadas? (ex. Kombucha)

() Frequentemente; () Semanalmente, () Mensalmente, () Raramente, () Nunca

Aspetto geral:	TX1	TY2	TZ3
9 - Gostei extremamente			
8 - Gostei muito			
7 - Gostei moderadamente			
6 - Gostei ligeiramente			
5 - Não gostei nem desgostei			
4 - Desgostei ligeiramente			
3 - Desgostei moderadamente			
2 - Desgostei muito			
1 - Desgostei extremamente			

Cor:	TX1	TY2	TZ3
9 - Gostei extremamente			
8 - Gostei muito			
7 - Gostei moderadamente			
6 - Gostei ligeiramente			
5 - Não gostei nem desgostei			
4 - Desgostei ligeiramente			
3 - Desgostei moderadamente			
2 - Desgostei muito			
1 - Desgostei extremamente			

Aroma:	TX1	TY2	TZ3
9 - Gostei extremamente			
8 - Gostei muito			
7 - Gostei moderadamente			
6 - Gostei ligeiramente			
5 - Não gostei nem desgostei			
4 - Desgostei ligeiramente			
3 - Desgostei moderadamente			
2 - Desgostei muito			
1 - Desgostei extremamente			

Desenvolvimento de bebidas fermentadas a partir de subprodutos de ananás dos Açores

Sabor:	TX1	TY2	TZ3
9 - Gostei extremamente			
8 - Gostei muito			
7 - Gostei moderadamente			
6 - Gostei ligeiramente			
5 - Não gostei nem desgostei			
4 - Desgostei ligeiramente			
3 - Desgostei moderadamente			
2 - Desgostei muito			
1 - Desgostei extremamente			

Doce:	TX1	TY2	TZ3
9 - Gostei extremamente			
8 - Gostei muito			
7 - Gostei moderadamente			
6 - Gostei ligeiramente			
5 - Não gostei nem desgostei			
4 - Desgostei ligeiramente			
3 - Desgostei moderadamente			
2 - Desgostei muito			
1 - Desgostei extremamente			

Gaseificação:	TX1	TY2	TZ3
9 - Gostei extremamente			
8 - Gostei muito			
7 - Gostei moderadamente			
6 - Gostei ligeiramente			
5 - Não gostei nem desgostei			
4 - Desgostei ligeiramente			
3 - Desgostei moderadamente			
2 - Desgostei muito			
1 - Desgostei extremamente			

Intenção de compra:	TX1	TY2	TZ3
5 - De certeza que compraria			
4 - Provavelmente compraria			
3 - Não sei se compraria			
2 - Provavelmente não compraria			
1 - De certeza que não compraria			

Ordene por ordem de preferência (decrecente): ____ < ____ < ____

Muito obrigado pela sua ajuda! Tem algum **comentário ou sugestão**?
