



ANNAYARA CELESTINA FERREIRA FERNANDES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
FERMENTADO ALCOÓLICO E VINAGRE DE
FÍSALIS E PITAIA COMO ESTRATÉGIA DE
APROVEITAMENTO TECNOLÓGICO**

LAVRAS – MG

2016

ANNAYARA CELESTINA FERREIRA FERNANDES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FERMENTADO ALCOÓLICO
E VINAGRE DE FÍSALIS E PITAIA COMO ESTRATÉGIA DE
APROVEITAMENTO TECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Doutor Disney Ribeiro Dias

Coorientadora

Rosane Freitas Schwan

Coorientadora

Angélica Cristina de Souza

LAVRAS - MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Fernandes, Annayara Celestina Ferreira.

Produção e caracterização de fermentado alcoólico e vinagre de
físalis e pitaia como estratégia de aproveitamento tecnológico / Annayara
Celestina Ferreira Fernandes. – Lavras: UFLA, 2016.

108 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) –Universidade Federal de Lavras,
2016.

Orientador(a): Disney Ribeiro Dias.

Bibliografia.

1. Fermentação Alcoólica. 2. Fermentação acética. 3. Atividade
Antioxidante. 4. Antimicrobiano. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu orientador(a).

ANNAYARA CELESTINA FERREIRA FERNANDES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FERMENTADO ALCOÓLICO
E VINAGRE DE FÍSALIS E PITAIA COMO ESTRATÉGIA DE
APROVEITAMENTO TECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de fevereiro de 2016.

Dra. Carolina Valeriano de Carvalho	UFLA
Dra. Sabrina Carvalho Bastos	UFLA
Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart	UNILAVRAS

Dr. Disney Ribeiro Dias
Orientador

**LAVRAS – MG
2016**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida e pela saúde e força para vencer todos os obstáculos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, por permitirem que eu realizasse o trabalho com todas as ferramentas necessárias.

Ao professor Disney, pela orientação, ensinamentos, oportunidade e por acreditar e confiar em mim.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pelos valiosos ensinamentos e por ceder o espaço necessário em seu laboratório para a realização deste trabalho.

A FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

Agradeço a minha mãe, Adriana; ao meu pai, Alexandre; à minha avó Andrelina, ao meu avô Aniceto (*in memoriam*); aos meus tios, irmãos e primos, pelo constante amor, carinho, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Não fosse por eles, eu não teria motivação para lutar dia a dia.

Gostaria também de agradecer ao Carlos Gustavo Pavan, que está sempre ao meu lado, dando-me força e amor, me ajudando nos momentos em que necessito e me proporcionando muitos momentos de felicidade.

Às minhas queridas amigas da república Joia Rara e à Raquel, pelos inúmeros momentos de felicidade e companheirismo.

Agradeço à minha coorientadora, doutora Angélica Cristina de Souza, uma pessoa muito querida que me auxiliou em várias etapas deste processo, repassando seu conhecimento com dedicação e paciência.

A Aline Pereira, Monique Inácio e Poliane, pela ajuda prestada neste trabalho, que foi de grande valia.

Às doutoras Gabriela e Suzana, pela contribuição valiosa em algumas análises essenciais do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia, pela convivência, em especial, Bárbara Godinho e Déborah Braga, por toda a amizade e por sempre terem me dado uma palavra amiga nos momentos desesperadores. E aos queridos Amigos que estiveram presentes nessa etapa da minha vida: Juliana Tensol, Ana Luiza, Jorge Pamplona, Luciana Ribeiro, Karla, Monique Silva Pamela, Acsa, Nádia, Cíntia, Bia, Dayana e Aline Galvão.

A todos os funcionários envolvidos no nosso dia a dia de trabalho, especialmente Rose, Jaja, Ivani, Cidinha e Paulinho.

A todos os funcionários, professores e colegas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A produção de frutas exóticas tem despertado a atenção de consumidores, comerciantes e, por consequência, produtores em escala familiar e de médio e grande porte. A associação dessas frutas a propriedades nutraceuticas, tais como elevados teores de substâncias antioxidantes e anticancerígenas, aumenta a aceitabilidade pelo consumidor, que está em busca de uma dieta balanceada nutricionalmente e saudável. O processo de comercialização das frutas transformadas em produtos industrializados, como, por exemplo, o fermentado alcoólico e o vinagre, pode ser uma boa alternativa para os pequenos produtores e uma possível disseminação dessas plantas pelo Brasil. Os objetivos, neste trabalho, foram o desenvolvimento de fermentados alcoólicos e acéticos (vinagre) de físalis e pitaia, a determinação do potencial antioxidante dos vinagres e a avaliação da aceitação do novo produto e do potencial antimicrobiano. Inicialmente foi produzido o fermentado alcoólico das frutas, utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 e as fermentações foram monitoradas diariamente, avaliando-se o número de células viáveis em suspensão, pH, grau Brix e realizando-se análises cromatográficas de compostos de interesse. Os teores de etanol, ao final do processo fermentativo alcoólico, foram de 80,95 g.L⁻¹ (10,2 °GL) no mosto de físalis e de 84,71 g.L⁻¹ (10,6 °GL) no mosto de pitaia. Na sequência foram elaborados os fermentados acéticos em biorreator de bancada, utilizando-se cultura mista de bactérias acéticas *Acetobacter aceti* (CCT 0190), *Acetobacter pasteurianus* (CCMA 0239) e *Gluconobacter oxydans* (CCMA 0350). O rendimento de ácido acético foi de 75% e a produtividade de 0,30 g.L⁻¹.h⁻¹, para o vinagre de físalis e de 72% de rendimento e 0,46 g.L⁻¹.h⁻¹ de produtividade, para o vinagre de pitaia. Os fermentados alcoólicos e acéticos de físalis e pitaia apresentaram polifenóis e capacidade antioxidante, sendo, portanto, fontes de substâncias bioativas. O vinagre pode ser produzido com sucesso a partir do fermentado alcoólico de físalis e pitaia, utilizando-se cultura mista de *A. aceti*, *A. pasteurianus* e *G. oxydans*.

Palavras-chave: Fermentação Alcoólica. Fermentação acética. Atividade Antioxidante. Antimicrobiano.

ABSTRACT

The production of exotic fruits has attracted the attention of consumers, traders and, consequently, producers on familiar, medium and large scale. The association of these fruits to the nutraceutical properties, such as high levels of antioxidants and anti-cancer substances, increases acceptance by the consumer, who is seeking a nutritionally balanced and healthy diet. The sale of fruits processed into industrial products, such as the alcoholic fermentation and vinegar can be a good alternative for small producers and a possible spread of these plants in Brazil. The objectives of this study were to develop alcoholic fermentation and acetic (vinegar) of físalis and pitaya, the determination of the antioxidant potential of vinegars and evaluation of acceptance of the new product and the antimicrobial potential. Initially was produced alcoholic fermentation of the fruits, using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 and the fermentations were monitored daily, measuring the number of viable cells in suspension, pH, Brix and carrying out analyzes chromatographic compounds of interest. The ethanol concentration at the end of the alcoholic fermentation process, were 80.95 g.L⁻¹ (10.2 °GL) in the físalis must and 84.71 g.L⁻¹ (10.6 °GL) in the pitaya must. In sequence, the acetic fermentation were prepared in bioreactor bench, using mixed culture of acetic bacteria: *Acetobacter aceti* (CCT 0190), *Acetobacter pasteurianus* (CCMA 0239) and *Gluconobacter oxydans* (CCMA 0350). The yield of acetic acid was 75% and productivity of 0.30 gL⁻¹.h⁻¹ for físalis vinegar and 72% yield and 0.46 gL⁻¹.h⁻¹ productivity for pitaya vinegar. The alcoholics fermented and físalis and pitaya acetic showed polyphenols and antioxidant capacity, and therefore sources of bioactive substances. The vinegar can be successfully produced from alcoholic fermented físalis and pitaya, using a mixed culture of *A. aceti*, the *pasteurianus* and *G. oxydans*.

Keywords: Alcohol Fermentation. Acetic Fermentation. Antioxidant Activity. Antimicrobial.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO GERAL	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Físalis	11
2.2	Pitaia	12
2.3	Elaboração de vinagre	14
2.3.1	Fermentação alcoólica	14
2.3.2	Fermentação acética	16
2.3.3	Bactérias acéticas para a elaboração do vinagre	17
2.4	Compostos presentes no vinagre	19
2.5	O vinagre e a sua importância nutricional	20
2.6	Atividade antimicrobiana do vinagre	22
2.7	Importância dos antioxidantes alimentares	24
2.8	Considerações finais	27
	REFERÊNCIAS	28
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	38
	ARTIGO 1 Produção e caracterização de fermentado alcoólico e vinagre de físalis e de pitaia como estratégia de aproveitamento tecnológico	38
1	INTRODUÇÃO	41
2	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	96

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a produção de frutas exóticas tem despertado a atenção de consumidores, agentes comerciantes e, por consequência, produtores em escala familiar e de médio e grande porte. A associação dessas frutas a propriedades nutracêuticas, tais como elevados teores de substâncias antioxidantes e anticancerígenas, aumenta a aceitabilidade pelo consumidor, que está em busca de uma dieta balanceada nutricionalmente e saudável.

Dentre essas frutas exóticas, podem-se citar a físalis, que é de grande valor econômico e está sendo incorporada no quadro das pequenas frutas no Brasil, e a pitáia, que é uma cactácea pertencente ao gênero *Hylocereu* e que tem alto potencial agrônômico e econômico. Essas frutas podem ser uma excelente opção de cultivo e de rendimento econômico, especialmente para propriedades rurais de base familiar, devido às propriedades nutricionais e ao valor dos produtos agregados a esta produção.

O processo de comercialização das frutas transformado-as em produtos industrializados, como, por exemplo, em fermentado alcoólico e vinagre, pode ser uma boa alternativa para os pequenos produtores e uma possível disseminação dessas plantas pelo Brasil.

Tradicionalmente, a fermentação de vinhos é proveniente do mosto de uva, matéria-prima principal dessa produção. No entanto, bebidas fermentadas de outras frutas constituem produtos promissores, devido à tendência de aceitação em pesquisas de consumo. A transformação das frutas em bebidas fermentadas é um processo biotecnológico no qual principalmente as leveduras utilizam os nutrientes do mosto para crescimento, com a produção de vários

metabólitos, convertendo um líquido açucarado numa solução de água-álcool com sabor e aroma agradável.

O vinagre é um produto resultante da fermentação acética do vinho, realizada por bactérias acéticas. Este produto tem sido parte da alimentação humana desde a Antiguidade, como condimento e conservante de alimentos. A grande apreciação por parte dos consumidores tem impulsionado a produção de vinagre dos mais variados substratos, como frutas, vegetais, mel, substratos ricos em amido, melaço ou caldo de cana e aguardentes, entre outros.

A produção do vinagre é realizada pela fermentação acética por meio da ação de bactérias do ácido acético (BAA) que, em condições aeróbicas, oxidam o etanol a ácido acético. No processo de fabricação de vinagres são comumente utilizadas as culturas de *Acetobacter* e *Gluconobacter*, pois elas se diferenciam das outras pela sua capacidade de oxidação total do etanol.

O vinagre produzido a partir de frutas pode ser considerado um bom complemento da alimentação humana, pois, em geral, são ricos em ácidos orgânicos, aminoácidos e vitaminas. Os principais ácidos orgânicos incluem ácido acético, ácido tartárico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido cítrico e ácido málico. A composição desses vinagres depende das características inerentes de cada tipo de fruta utilizada na produção

Assim, é interessante a produção de fermentados alcoólicos e vinagres de frutas que tenham qualidades sensoriais e nutritivas. Como não se verifica no mercado consumidor brasileiro o uso de físalis e pitaia como matéria-prima para a produção de vinagres, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de elaborar fermentado alcoólico e vinagre, visando ao aproveitamento das propriedades funcionais dessas frutas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Físalis

O gênero *Physalis* é encontrado em regiões temperadas, quentes e subtropicais e pertence à família Solanaceae. O fruto é originário dos Andes, mas o maior país produtor se encontra na América do Sul, a Colômbia, onde é comercializado com o nome em espanhol, *uchuva* (*cape gooseberry*, em inglês) (FRANCO et al., 2007). A inserção do fruto físalis no Brasil visava ao melhoramento genético e teve início em 1999, na Estação Experimental de Santa Luzia, SP (RUFATO et al., 2008).

No Brasil, as espécies que são mais comuns de se encontrar são a *Physalis peruviana* e *P. angulata*, e o principal produtor desses frutos “in natura” é o Rio Grande do Sul (PAGOT; HOFFMANN, 2003).

O fruto é formado por uma baga pequena, redonda e exótica, com polpa de cor amarela a alaranjada-escura, semelhante em forma e estrutura ao tomate, e pode apresentar entre 150 a 300 sementes (CORPORACION COLOMBIANA INTERNACIONAL, 2000; NURIT SILVA; AVILA et al., 2006). São envoltos parcial ou completamente por um involúcro foliar em forma de um balão conhecido por cálice, que tem como finalidade a proteção do fruto contra patógenos, insetos ou condições climáticas adversas que podem diminuir a vida de prateleira desse fruto (ALVARADO; BERDUGO; FISCHER, 2004).

Os frutos de físalis têm sabor adocicado e levemente ácido, com alto teor de vitaminas A e C, fósforo e ferro, além de flavonoides e fitoesteroides, com teor de sólidos solúveis que varia entre 11 a 15° Brix, com o avanço da maturação (AGUILAR et al., 2006; LANCHERO et al., 2007; CARRASCO; ZELADA, 2008).

De acordo com Fontana et al. (2000), os frutos de *físalis* apresentam compostos bioativos, o que é devido ao seu expressivo conteúdo de constituintes químicos, como flavonoides simples ou glicosilados, carotenoides, ácido ascórbico e alcaloide, que contribuem para a captura de radicais livres atuando como antioxidantes. Assim, essa fruta tem despertado interesse por seus efeitos benéficos à saúde, devido à sua ação antioxidante, atuando como mecanismo de defesa contra os radicais livres.

O consumidor está em busca da suplementação alimentar a partir da diversificação de uma alimentação à base de frutas. Como o fruto de *físalis* apresenta propriedades nutricionais como os altos teores de substâncias antioxidantes e anticancerígenas, a inserção do fruto no mercado desperta o interesse de produtores de médio e grande porte (CHAVES; SCHUCH; ERIG, 2005).

Poltronieri (2003) relata que o cultivo do *físalis* tem se propagado devido ao baixo custo de implantação e à facilidade de reprodução, o que torna sua produção acessível também para pequenos produtores, devido à boa adaptação da espécie.

2.2 Pitaia

Com alto potencial agrônomo e econômico, a pitaia é uma cactácea pertencente ao gênero *Hylocereus*. É uma planta rústica da família Cactaceae e é conhecida mundialmente como “dragon fruit” (fruta-do-dragão) (ORTIZ; LIVERA, 1995).

Dentre as várias espécies de pitaia, destacam-se a *Hylocereus polyrhizus* (pitaia vermelha de polpa vermelha) e a *Hylocereus undatus* (pitaia vermelha de polpa branca), que estão entre as mais produzidas e comercializadas, uma vez

que apresentam sabor agradável, com grande aceitação sensorial pelos consumidores (MERTEN, 2003; JUNQUEIRA et al., 2010).

O fruto exibe formato globoso a elipsoide, com 10 a 12 cm de diâmetro (HERNÁNDEZ, 2000), com casca vermelha e polpa branca, que é a parte comestível do fruto, formada por massa de textura mucilaginosa, com sementes pequenas e macias distribuídas homogeneamente e representando de 60% a 80% do peso dos frutos maduros, e sabor suave e refrescante. Dentre os açúcares presentes na polpa, destacam-se a glicose e a frutose (PIMIENTA BARRIOS ; TOMAS-VEGA, 1993; LE BELLEC; VAILLANT; IMBERT, 2006).

Frutos frescos apresentam, em geral, baixos valores de acidez total (2,4% a 3,4%), sólidos solúveis entre 7,1 e 10,7 °Brix e conteúdos minerais relativamente altos de potássio, magnésio e cálcio (CAVALCANTE, 2008). Pitaias de casca vermelha são ricas em vitaminas A e C.

Wu (2006) encontrou quantidades consideráveis de compostos fenólicos na polpa e na casca da pitaiá. Os resultados dos seus estudos mostraram que a casca de pitaiá pode ser uma boa fonte de antioxidantes e um agente antimelanoma. Assim, resíduos da casca da pitaiá devem ser considerados um produto valioso, pois podem auxiliar na prevenção de doença crônica.

A presença de diversas substâncias antioxidantes na pitaiá, como o ácido ascórbico, carotenoides e polifenóis, tem despertado o interesse nesse fruto, devido ao potencial efeito benéfico dessas substâncias para a saúde humana. O estresse oxidativo está associado ao aparecimento de várias doenças degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares (MAHATTANATAWEE et al., 2006). Alguns estudos têm demonstrado que a pitaiá apresenta boa capacidade antioxidante *in vitro* (BELTRÁN-OROZCO et al., 2009; MAHATTANATAWEE et al., 2006; CHOO; YONG 2011).

De acordo com alguns estudos, a pitaiá pertence ao grupo de frutíferas tropicais consideradas promissoras para o cultivo, devido à sua aparência

exótica, sabor doce e suave, polpa firme e às suas propriedades nutricionais e funcionais (MARQUES et al., 2011; MOREIRA et al., 2011).

2.3 Elaboração de vinagre

Na produção de um vinagre estão envolvidos, basicamente, dois processos fermentativos: a fermentação alcoólica e a fermentação acética.

A fermentação, do ponto de vista tecnológico, é um processo controlado pelo homem em que atuam microrganismos sobre substratos orgânicos por meio de suas enzimas, produzindo determinadas substâncias de utilidade para o homem. Essas substâncias ou produtos de fermentação vão desde alimentos modificados e bebidas alcoólicas a outros produtos industriais, como solventes, ácidos orgânicos, ésteres, aminoácidos, polissacarídeos, enzimas, vitaminas, antibióticos e hormônios (CUNHA, 2010).

2.3.1 Fermentação alcoólica

Acredita-se que desde 10.000 anos a.C. já se elaborava vinho, então, a fermentação alcoólica é um processo antigo que tem sido realizado durante muitos séculos (WARD, 1991). Há registros do desenvolvimento da fermentação alcoólica pelos povos egípcios e sumérios, com emprego na fabricação de vinhos e cervejas (WARD, 1991; ROSS; MORGAN; HILL., 2002).

A fermentação alcoólica é um método de preservação de alimentos e bebidas. É um processo em que ocorre a degradação anaeróbica da glicose, com a transformação de açúcares em etanol e CO₂, catalisado por enzimas. É realizado, principalmente, por leveduras, com o objetivo de obter energia na forma de ATP, a qual será utilizada para a realização de suas atividades

fisiológicas, crescimento e reprodução, sendo o etanol, então, um subproduto desse processo (LIMA et al., 2001).

A fermentação compreende um conjunto de reações enzimaticamente controladas, por meio das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples, liberando energia. O processo tem início com a ativação da glicose, que recebe, em reações sucessivas, dois fosfatos energéticos fornecidos por duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) que se transforma em adenosina difosfato (ADP). O rendimento é de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose utilizada (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001).

Os álcoois superiores, glicerol, aldeídos, ésteres e acetatos, são componentes formados durante a fermentação alcoólica, mas em menor quantidade, pois o etanol é que é formado em maior quantidade. Mas, estes compostos formados são de grande importância para a formação do aroma de bebidas alcoólicas fermentadas, como, por exemplo, o vinho (LURTON et al., 1995; DIAS, 1996; MARQUES; PASTORE, 1999).

As leveduras são os principais microrganismos que realizam a fermentação; são fungos que se apresentam, caracteristicamente, sob forma unicelular, com tamanho médio de 5 a 8 μm de diâmetro (PACHECO; SGARBIERI, 2002).

Algumas leveduras são mais indicadas para realizar a produção de bebidas alcoólicas devido à sua habilidade de converter fontes de açúcares em álcool, serem resistentes e conseguirem sobreviver a altas concentrações de etanol, além de conferirem às bebidas sabor e aroma agradáveis (FRAZIER; ESTHOFF, 1988). Dentre os microrganismos que realizam a fermentação alcoólica destacam-se as leveduras *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Bettanomyces* e *Kloeckera* (DUARTE et al., 2010).

A maioria dos processos de produção de fermentados alcoólicos utiliza cepas de *S. cerevisiae*, visto que estas culturas produzem fermentações mais rápidas e confiáveis. Dessa forma, as leveduras são selecionadas para otimizar o processo e intensificar a qualidade da matéria-prima, tendo como consequência um produto de melhor aceitabilidade e qualidade. Além disso, *S. cerevisiae* é mais tolerante aos produtos da fermentação e mudanças de pH no decorrer do processo fermentativo, e é produtora superior de etanol (DUARTE et al., 2010).

2.3.2 Fermentação acética

De acordo com Cunha (2010), a fermentação acética pode ser entendida como a transformação do álcool em ácido acético pela ação de determinadas bactérias, conferindo o gosto característico de vinagre. São as bactérias do ácido acético (BAA) que, em condições aeróbicas, oxidam o etanol a ácido acético, dando origem ao vinagre. As bactérias acéticas constituem um grupo de microrganismos de amplo interesse econômico, de um lado pela sua função de produção de ácido acético e, de outro, pelas alterações que provocam em alimentos e bebidas (HOFFMANN, 2006).

A fermentação acética corresponde a um processo aeróbio de fermentação biológica em que um substrato com uma concentração de etanol de 50 a 100g/L é parcialmente oxidado pela ação da bactéria do ácido acético, para produzir ácido acético e água. O resultado é uma solução com alta concentração de ácido acético e uma pequena quantidade de etanol residual não convertido, junto com um bom número de produtos secundários (ORY; ROMERO; CANTARERO, 1998).

Além do ácido acético são produzidas pequenas quantidades de outros produtos, como aldeídos, cetonas, ésteres e outros ácidos orgânicos, sendo o acetaldeído o composto secundário predominante (SACHS, 1990).

No processo de oxidação de etanol a ácido acético pelo método tradicional (lento, Orléans ou fermentação em superfície), as BAA crescem abundantemente, em contato com o oxigênio, formando uma camada de células na superfície do mosto fermentado (contendo etanol) e promovem a acetificação (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001; TESFAYE, 2002).

No processo rápido alemão (ou Boerhave), as BAA estão aderidas a um material sólido (carvão, madeira) dentro de um tanque (gerador de vinagre ou vinagreira) ao qual se adiciona o vinho a ser acetificado (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001).

Na produção industrial emprega-se a fermentação submersa, na qual culturas de BAA são inoculadas em fermentador em processo semicontínuo para a obtenção de vinagre mais rapidamente (NATERA et al., 2003). Em inóculos com população de BAA próxima de 10^6 células/mL o processo lento pode ocorrer em 30 dias.

2.3.3 Bactérias acéticas para a elaboração do vinagre

As bactérias do ácido acético (BAA) são gram-negativas, motilidade positiva ou negativa, mesófilas e aeróbias obrigatórias. A morfologia varia de formas elipsoidais a bastonetes, que podem ocorrer como célula única, em pares ou em cadeias. Elas oxidam açúcares, álcoois e etanol, com produção de ácido acético como o principal produto final. Formam película ou crosta na superfície da cultura, vulgarmente chamada de “mãe do vinagre”, de onde partem os repiques. Essas películas variam de acordo com a espécie, podendo ser delgadas, espessas, contínuas ou em ilhas (RASPOR; GORANOVIC, 2008; AQUARONE et al., 2001).

Os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* são comumente utilizados para a produção de vinagre, pois se diferenciam pela capacidade de oxidação total do

etanol. As espécies pertencentes ao gênero *Acetobacter* são capazes de oxidar o etanol a ácido acético por atuação das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e acetaldeído desidrogenase (ALDH). Quando o etanol se esgota, as *Acetobacter* podem oxidar o ácido acético a $H_2O + CO_2$, pelo ciclo do ácido tricarbóxico (CAT). Esta última reação caracteriza a total oxidação do etanol. As espécies pertencentes ao gênero *Gluconobacter*, que também são capazes de oxidar o etanol a ácido acético por atuação das enzimas ADH e ALDH, quando o etanol se esgota, não são capazes de oxidar o ácido acético. Isso ocorre porque as espécies de *Gluconobacter* não apresentam seu CAT completo, devido à ausência das enzimas α -cetoglutarato desidrogenase e succinato desidrogenase (RASPOR; GORANOVIC, 2008).

Na produção da fermentação acética é comum o uso de culturas mistas de *Acetobacter* e *Gluconobacter*, pois a combinação dessas duas culturas de BAA, de acordo com alguns estudos, é mais eficiente para a produção de vinagre (SENGUN; KARABIYIKLI, 2011).

Para suportar o processo de fabricação de vinagres, as culturas de *Acetobacter* e *Gluconobacter* devem apresentar algumas características. Então, a cultura selecionada deve ser tolerante a altas concentrações de etanol e ácido acético, como também baixos valores de pH, níveis de aeração e requerimento nutricional. É, ainda, de fundamental importância que a cultura de BAA selecionada seja resistente ao ataque de fagos e que seja capaz de suportar temperaturas altas, próximas a 38 °C (SENGUN; KARABIYIKLI, 2011; RASPOR ; GORANOVIC, 2008).

Para a obtenção de um vinagre de alta qualidade, ainda é preciso que as BAA selecionadas produzam compostos de aroma desejáveis. A conversão do etanol a ácido acético é uma reação do metabolismo primário das BAA. Esta conversão é acompanhada por reações do metabolismo secundário, durante o qual pode haver a formação de diferentes compostos, dependendo do substrato

utilizado para a elaboração do vinagre. A combinação desses produtos do metabolismo primário e secundário destas BAA é responsável pelo sabor e aroma característico de cada vinagre (RASPOR ; GORANOVIC, 2008).

2.4 Compostos presentes no vinagre

Durante a fermentação alcoólica e acética ocorre a formação de compostos que irão conferir sabor e aroma ao vinagre. O aroma é um dos mais importantes indicadores qualidade e, por esta razão, a escolha de matéria-prima e as condições ótimas de acetificação são fatores fundamentais para a formação desses compostos (CALEJÓN et al., 2008).

Embora a maior parte dos compostos voláteis já esteja presente no vinho, o teor final está intimamente relacionado com as características genuínas do próprio vinagre (GONZÁLES; CHOZAS, 1987). O sabor de vinagre de vinho é determinado por uma série de constituintes voláteis de três origens diferentes: substrato, acetificação e, em alguns casos, envelhecimento em madeira. Durante a acetificação, compostos voláteis provenientes do vinho podem sofrer importantes transformações (NATERA et al., 2003).

De acordo com Callejon et al. (2008), mais de 70 componentes aromáticos já foram identificados nos vinagres de vinho, incluindo ácidos, álcoois, ésteres, compostos carbonílicos, fenóis, lactonas e acetais. O aroma é, portanto, o resultado de uma combinação de várias características químicas, abrangendo uma vasta gama de polaridade, solubilidade e volatilidade.

Em relação ao teor de ácidos orgânicos, vinagres contêm ácidos voláteis (ácido acético, isovalérico, entre outros) e não voláteis (tartárico, cítrico, málico, succínico). O ácido que identifica o produto como vinagre, desde o início, é o acético e está presente em elevadas concentrações. Seu teor pode variar, dependendo do substrato usado ou de uma possível diluição antes de sair para o

mercado (NATERA et al., 2003). A legislação brasileira estabelece em 4% o teor mínimo de ácido acético para vinagre (BRASIL, 1999); para consumo deve ter entre 4% e 6% de ácido acético.

Os álcoois mais abundantes no vinagre de vinho são o etanol e o metanol, principalmente em vinagres de vinhos (CALLEJON et al., 2008).

O teor de etanol em vinagres representa o resíduo do processo de acetificação. Segundo a legislação vigente, o limite máximo de etanol em vinagres comerciais é de 1% v/v (BRASIL, 1999). Durante o processo fermentativo, procura-se o maior rendimento possível da transformação de etanol em ácido acético. Porém, o vinagre deve conter um pouco de etanol, pois, caso contrário, as bactérias acéticas, na ausência de um substrato alcoólico, podem degradar o ácido acético produzido (MORALES et al., 2001).

Os constituintes produzidos na acetificação são específicos para alguns vinagres e podem ser determinados pelas características da matéria-prima e a tecnologia de processamento. Portanto, o vinagre pode ser caracterizado e diferenciado pela quantidade e a qualidade da análise de seus compostos.

2.5 O vinagre e a sua importância nutricional

O vinagre é um produto de fácil acesso no Brasil, porém, pouco valorizado comercialmente, devido, em parte, ao desconhecimento do consumidor de suas propriedades funcionais (ADAMS, 1998).

A importância do vinagre na alimentação decorre de suas inúmeras formas de utilização, ou seja, como condimento, conferindo gosto e aroma aos alimentos em que é adicionado; como conservante e sendo bastante útil como agente amaciante de carnes temperadas e legumes em conservas. Além disso, é muito empregado como agente sanitizante, devido à sua ação bactericida (GRANADA et al. 2000).

O vinagre é muito semelhante às substâncias químicas naturalmente secretadas no estômago e, por isso, ele tem fama de facilitador da digestão (ANAV, 2010). Tem também ação de regulação da glicose sanguínea (EBIHARA; NAKAJIMA, 1988), controle da pressão arterial, estimulação do apetite e promoção da absorção de cálcio (XU; TAO; AO, 2007).

Os efeitos benéficos à saúde resultantes do consumo moderado de vinho têm sido amplamente estudados nos últimos anos. Esses efeitos têm sido atribuídos, principalmente, ao conteúdo de polifenóis e da atividade antioxidante desses compostos (ALONSO et al., 2004). Produtos derivados do vinho, dentre eles o vinagre, também contêm polifenóis e podem apresentar certa atividade antioxidante, contribuindo igualmente para um efeito protetor do organismo.

São encontrados, na literatura, diversos trabalhos que destacam as propriedades biológicas do vinagre e os benefícios à saúde que o produto pode proporcionar. Xu et al. (2011) verificaram atividade antioxidante e compostos de alto peso molecular (melanoidinas), formados durante o processo de produção de vinagre aromático *zhenjiang* concentrado.

Além da presença de compostos polifenólicos, o vinagre apresenta uma série de ácidos orgânicos, dos quais o principal é o ácido acético. Estudos comprovam o efeito bactericida e bacteriostático desses ácidos (SILVA et al., 2001), bem como elevada atividade antimutagênica (LANKAPUTRA; SHAH, 1998).

Segundo Budak e Guzel-Seydim (2010), a presença de compostos fenólicos em vinhos e vinagres tem efeito positivo para a saúde, devido ao seu efeito antioxidante. Estes autores estudaram a produção de vinagre de uva *Ulugbey Karasi* e constataram a presença de atividade antioxidante e de compostos fenólicos no vinagre produzido.

2.6 Atividade antimicrobiana do vinagre

A incidência de infecções de origem alimentar causadas pelos patógenos bacterianos continua a ser um problema nas nações industrializadas e em países em desenvolvimento (FANG; HSUEH, 2000; LAMPEL; ORLANDI; KORNEGAY, 2000).

Muitos produtos naturais, incluindo plantas, ervas e certos alimentos que contêm substâncias antimicrobianas, sua atividade antimicrobiana estudada. A elevada quantidade de ácido acético do vinagre tornou-se muito eficaz na prevenção de intoxicação alimentar bacteriana (MEDINA et al., 2007). Os microrganismos comumente envolvidos em contaminação de alimentos são *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum*, dentre outros. Os alimentos mais comprometidos e afetados pela contaminação microbiana são, em sua maioria, provenientes de animais e produtos derivados destes, como carnes, leite, ovos e queijos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

A *Salmonella* é um gênero de bactérias amplamente distribuído na natureza. Pode ser isolada de locais variados, inclusive matérias-primas alimentares, além de poder ser veiculada pelo homem na condição de portador assintomático (XIA et al., 2012).

Escherichia coli é o principal representante do grupo dos coliformes termotolerantes. Apresenta-se como bastonetes gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, e podem contaminar carne, leite e vegetais (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Staphylococcus aureus pertence à família Micrococcaceae e se apresenta no formato de cocos gram-positivos, não esporulados e anaeróbios facultativos.

Pode crescer em uma margem ampla de temperatura, entre 7 °C e 49 °C, com produção de toxinas entre 10 °C e 48 °C (JAY, 2005).

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos. Sua morfologia a caracteriza como bacilo, com extremidades arredondadas e flagelos peritríquios (ADAMS; MOSS, 2004). Tem capacidade de crescer em temperaturas variadas, entre -0,4 e 50 °C, e sua natureza psicrotrófica possibilita seu desenvolvimento em alimentos ainda que refrigerados (BORUCKI et al., 2003).

De acordo com Medina et al. (2007), o vinagre reduziu a contagem de *Salmonella enteritidis* e *E. coli*. Outros autores estudaram o vinagre (ácido acético) pela sua eficácia na remoção de patógenos de frutas e legumes frescos (RHEE et al, 2003; WU et al., 2000).

Utyama (2003) estudou *in vitro* a atividade antimicrobiana do ácido acético e do vinagre, por meio da técnica de difusão de poço sobre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus* e determinou a concentração inibitória mínima (CMI). Verificou que, pelo método de difusão de poço, os vinagres branco e tinto (30,0% e 25,0%) e o ácido acético a 1,0% são mais eficazes que o ácido acético a 0,7% e vinagre branco e tinto a 10,0% ($p < 0,05$) sobre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e não apresentaram ação antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*. A CIM do ácido acético nas cepas avaliadas foi a 0,25% e a do vinagre branco a 2,0%, para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e para *Staphylococcus aureus*, a 3,0%. As cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli* foram todas inibidas pelo vinagre tinto a 1,5% e sobre as de *Staphylococcus aureus*, a 3,0%.

2.7 Importância dos antioxidantes alimentares

Nos últimos anos, tem se incentivado o consumo de alimentos que apresentem atividade antioxidante para prevenir o estresse oxidativo e o surgimento de patologias associadas a este. Para Barreiros et al. (2006), antioxidantes são substâncias que têm o poder de inibir a oxidação, diminuindo a concentração dos radicais livres no organismo ou quelando íons metálicos, assim prevenindo a peroxidação lipídica. Os antioxidantes que apresentam uma possível ação benéfica no organismo são os carotenoides, os flavonoides e as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol).

Os radicais livres reagem com DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo agravos que podem colaborar para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose e artrite reumática, entre outras (MELO et al, 2006).

Os antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta são as principais substâncias encarregadas de eliminar o excedente de radicais livres no organismo. Quando não há um balanço entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante, ocorre o chamado “estresse oxidativo”. Os radicais livres em excesso que estão presentes em nosso corpo podem ser originados por defeitos na respiração mitocondrial, metabolismo do ácido araquidônico, ativação-inibição de sistemas enzimáticos ou por fatores exógenos, como poluição, hábito de fumar ou ingerir álcool ou, ainda, por uma nutrição inadequada (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005).

Com o aumento do interesse na função e na diversidade de antioxidante em alimentos, diversos métodos *in vitro* para a determinação da atividade antioxidante em alimentos (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005), bebidas e amostras biológicas têm sido desenvolvidos (). Esses métodos diferem em termos de seus princípios de ensaio e condições experimentais. Como várias

características e mecanismos de reação, geralmente, estão envolvidos, nenhum ensaio vai refletir com precisão todos os antioxidantes em um sistema misto ou complexo. Assim, para elucidar completamente um perfil completo de capacidade antioxidante, diferentes tipos de ensaios são requeridos (HUANG; OU; PRIOR, 2005; LI et al., 2009; PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005).

Diversos ensaios para a determinação da atividade antioxidante já estão disponíveis. Estes métodos podem ser baseados em captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução do metal (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, cooxidação do β -caroteno) (ARUOMA, 2003; FRANKEL; MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002), entre outros. Dentre estes métodos, ABTS, FRAP, DPPH e ORAC estão entre os mais utilizados atualmente (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURACALIXTO, 2006).

O 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta e tem absorção máxima na faixa de 515-520 nm. O método está baseado na capacidade de o DPPH reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes, o mesmo recebe H^+ , sendo, então, reduzido. Pode ser facilmente detectado por espectroscopia, devido à sua intensa absorção na região visível (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSSET, 1997; PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005). O DPPH apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos e representa, portanto, um excelente método para medir a atividade antioxidante em frutas e sucos de frutas (PRADO, 2009).

O ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity) é um método baseado na habilidade dos antioxidantes de capturarem, a longo prazo, o cátion radical $ABTS^{\bullet+}$. Esta captura produz um decréscimo na absorbância, que

é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos sendo representadas graficamente. A curva gerada pela inibição da absorbância é calculada, sendo os resultados interpolados na curva de calibração e expressos em capacidade antioxidante equivalente a 1 mM do trolox (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURACALIXTO, 2006).

Existe também a quantificação de compostos fenólicos, que é realizada por meio de uma variedade de métodos. Todavia, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) é o mais extensivamente empregado. É uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Tem sido utilizado para mensurar os fenólicos totais em produtos naturais e o seu mecanismo básico é uma reação de oxirredução. Esse método espectroscópico de Folin-Ciocalteu é um dos mais utilizados para a determinação de fenólicos totais em vegetais e bebidas. Baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico fosfotungstico pelas hidroxilas fenólicas, originando óxidos azuis de tungstênio (W8O23) e de molibdênio (Mo8O23), um complexo que absorve em $\lambda_{\text{máx}}=760$ nm (MOYER *et al.*, 2002).

Diferentes metodologias são utilizadas para caracterizar a capacidade antioxidante de alimentos, entretanto, não há qualquer método universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser quantificada com precisão. O interessante é aplicar mais de um método para avaliação da atividade antioxidante, pois cada método apresenta um princípio (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005).

O corpo humano é um sistema incompleto de defesa de antioxidante e, assim, é de grande importância a ingestão dietética de antioxidantes, pois essas substâncias apresentam vários benefícios, proporcionando melhoria na qualidade de vida da população. Os principais antioxidantes dietéticos são algumas vitaminas, compostos fenólicos e carotenoides (RATNAM *et al.*, 2006).

2.8 Considerações finais

O processo de comercialização das frutas, transformado-as em produtos industrializados, como, por exemplo, em fermentado alcoólico e vinagre, pode ser uma boa alternativa para os pequenos produtores e uma possível disseminação das plantas de físalis e pitaia pelo Brasil.

Os fermentados de frutas e vinagres, além de apresentarem compostos importantes para o sabor e o aroma das bebidas, têm antioxidantes e os vinagres apresentam atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M.O. **Food microbiology**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, England, 2004.

AGUILAR, R. M. et al. Agrofenoología de *Physalis peruviana* em invernadero y fertirriego. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, México, v. 12, p. 57-63, 2006.

ALONSO, Á. M. et al. Study of the antioxidante power of brandies and vinegars derived from Sherry and correlation with their contents in polyphenols. **Food Research International**, Barking, v.37, n. 7, p. 715-721. Mar. 2004.

ALVES, J A et al. Chemical, Physical-Chemical, and Sensory Characteristics of Lychee (*Litchi chinensis*?Sonn) Wines. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, p. S330-S336, 2011.

ALVARADO, P.A.; BERDUGO, C.A.; FISCHER, G. Efecto de um tratamiento a 1,5°C y dos humedades relativas sobre las características físico-químicas de fruto de uchuva *Physalis peruviana* L. durenteel posterior transporte y almacenamiento. **Agronomía Colombiana**, Colombia, v. 22, p. 147-159, 2004

ANAV, Associação Nacional das Indústrias de Vinagres. **Os diversos benefícios do vinagre**, 2010. Disponível em:
<http://www.anav.com.br/clipping_interna.php?id=3>. Acesso em: 17 ago. /2014.

ARUOMA, O. I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 9. n. 20, p. 523-524, 2003.

AVILA, J. A. et al. Influencia de La madurezdel fruto y del secado delcálizenuchuva (*Physalis peruviana*L.), almacenada a 18°C. **Acta Agronomica**, Colombia, v. 55, p. 29-38, 2006.

BARREIROS, L. B. S.; et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, 2006.

BARTHLOTT, W.; HUNT, D. R. Cactaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants*. **Springer**, Berlin, p.161-196, 1993.

BELTRÁN-OROZCO M. C. et al. Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). **Agrocienc.**, México, v. 43, v.2, p.153-62, 2009.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BORUCKI, M.K. et al. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington v. 69, n. 12, p. 7336-7342, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 36, de 14 de outubro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Fermentados Acéticos, conforme consta do Anexo desta Instrução Normativa Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2014.

BRASIL. **Lei Nº 7.678 de 08 de Novembro de 1988**. Brasília: Imprensa Nacional, 1988.

BUDAK, Havva N.; GUZEL-SEYDIM, Zeynep B. Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques, **Journal Science Food Agriculture**, New York, n.90, v. 12, p.2021-2026, jun. 2010.

CARRASCO, R. R.; ZELADA, C. R. E. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. **Revista Sociedad Química Perú**, Lima, v. 74, p. 108-124, 2008.

CALLEJÓN, R. M. et al. Defining the typical aroma of Sherry vinegar: sensory and chemical approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 17, p. 8086-8095, Sept. 2008.

CAVALCANTE, I. H. L. **Pitaya: propagação e crescimento de plantas**. 2008. 94 f. Tese (Doutorado em Ciência Agrárias) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. 2010. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 59, p. 418-422, 2010.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p. 1281-1287, 2005.

CHARLES, M. et al. Potent aroma compounds of two red wine vinegars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 1, p. 70-77, 2000.

CHOO, W.S.; YONG, W. K. Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits. **Adv Appl Sci Res.**, Rajasthan, v. 2, n. 3 p. 418-25, 2011.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 4, ago. 2001.

CORPORACIÓN COLOMBIANA INTERNACIONAL Analisis de los componentes del precio internacional de la uchuva. **Boletín Precios Internacionales**. Bogotá, n. 23, 2000.

CUNHA, Mário A. A. **Tecnologia das Fermentações**. Apostila (Curso de Graduação em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2010.

DIAS, D.R. et al. Elaboration of a fruit wine cocoa (*Thebroma cacao* L.) pulp. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.42, p.319-329, Mar. 2007.

DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F.; LIMA, L.C.O. Methodology for elaboration of fermented alcoholic beverage from yellow mombin (*Spondias mombin*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p.342-350, 2003.

DUARTE, W. F. et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 43, n. 10, p. 1564-1572, Dec. 2010a.

DUARTE, W. F. et al. Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus L.*). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 173-182, Oct. 2010b

DUARTE, W. F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, Apr. 2009.

EBIHARA, K.; NAKAJIMA, A. Effect of acetic acid and vinegar on blood glucose and insulin responses to orally administered sucrose and starch. **Agricultural and Biological Chemistry**, Japão, v. 52, n. 5, p. 1311-1312, 1988.

FANG, T.J. Bacterial contamination of ready-to-eat foods: concern for human toxicity. **Rev. Food Nutr. Toxic.**, Amsterdam, v. 6, p.143–171, 2005.

FONTANA, J. D. et al. Carotenóides: Cores atraentes e ação biológica. **Revista biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, p. 40 -45, 2000.

FRANCO, L. A. et al. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana L.* **Revista Biomédica**, v. 27, p. 110-115, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, 2000.

FRAZIER, W. C.; ESTHOFF, D.C. Microorganisms Important in food microbiology. In: FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. **Food Microbiology**. 5. ed. Singapore: McGraw-Hill Book Co, p. 32-39, 1988.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**. 3 ed. Zaragoza: Acribia, 522 p., p.351-359. 1985.

GRANADA, Grazielle G. et al. Vinagres de folhas de videira: aspectos sensoriais. **B.CEPPA**, Curitiba, v.18, n. 1, p. 5156, jan./jun. 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/viewFile/1124/925>>. Acesso em: 17 ago. 2014.

GONZÁLEZ, A. M. T.; CHOZAS, M. G. Volatile components in Andalusian vinegars. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 185, n. 2, p. 130-133, 1987.

HERNÁNDEZ, Y. D. O. **Hacia el conocimiento y la conservación de La pitahaya**. Oaxaca: IPN-SIBEJ-CONACYT-FMCN, 2000.

HOFFMANN, A. Sistema de produção de Vinagre. **Embrapa Uva e vinho**. Bento Gonçalves, Ago. 2006. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/Vinagre/legislacao.htm>>. Acesso em: 17 ago. 2014.

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

INTA. Instituto Nicaraguense de Tecnología Agropecuária. **Guía técnica para La producción de pitahaya**. São Marcos: INTA , 1994.

JAY, J. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JUNQUEIRA, K. P. et al. Variabilidade genética de acessos de pitaya com diferentes níveis de produção por meio de marcadores RAPD1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 3, p. 840-846, 2010.

LAMPEL, K.A., ORLANDI, P.A., KORNEGAY, L. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of foodborne bacterial pathogens. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington, v.60, p. 4539–4542, 2000.

LANCHERO, O. et al. Comportamiento de lauchuva (*Physalis peruviana*L.) em poscosecha bajo condiciones de atmósfera modificada activa. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, Las Palmas, v. 1, p. 61-68, 2007.

LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. **Mutation Research**, Amsterdam, v.397, p. 169-182, 1998.

LE BELLEC, F.; VAILLANT, F. ; IMBERT, E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. Cirad/EDP Sciences. **Fruits**, Paris, v.61, p.237-250, 2006.

LEE, C.; ACREE, T.; BUTTS, R. Determination of methyl alcohol in wine by gas chromatography. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 47, n. 4, p. 747-748, 1975.

LI, H. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, Oxford, v. 112, n. 2, p. 454-460, 2009

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Bucher, 2001.

LURTON, L. et al. Influence of the fermentation yeast strains on the composition of wine spirits. **Journal Science Food Agriculture.**, Great Britain. v.67, p.485-491, 1995.

MARQUES, D.M.; PASTORE, G.M. Produção de aromas naturais por microrganismos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 33, n. 1, p.80-85, 1999.

MARQUES, V. B. et al. Fenologia reprodutiva de pitaia vermelha no município de Lavras, MG. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.984-987, 2011.

MEDINA, E. et al. Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, Oxford, v. 70, n. 50, p. 1194-1199, 2007.

MELO, E. et al. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MERTEN S. A review of *Hylocereus* production in the United States. J PACD. Estados Unidos, v. 32, n.4, p.98-105, 2003.

MORALES, L. M. et al. Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: influence of acetification and aging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 212, n. 6, p. 676-682, 2001.

MOREIRA, R.A. ET AL. Crescimento de pitaia vermelha com adubação orgânica e granulado bioclástico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p.785-788, 2011.

MOYER, *et al.* Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 3, p. 519-525, 2002.

NATERA, R. et al. Chemometric studies of vinegars from different raw materials and processes of production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, p.3345-3351, 2003.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant Therapy: Myth or Reality? **J. Braz. Chem. Soc.**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 699-610, 2005.

NURIT SILVA, K., AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandraphysalodes* e *Physalisangulata* (Solanaceae). **Brazilian Journal of Pharmacosy**, São Paulo, v. 15, p. 344 – 351, 2005.

OLIVEIRA, M. E. S. et al. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, 2011.

ORY, I. D.; ROMERO, E. L.; CANTERO, D. Modeling the kinetics of growth of *Acetobacteracetii* discontinuous culture: influence of the temperature of operation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 49, p. 189-193, 1998.

ORTIZ, H.Y.D.; LIVERA, M.M. La pitahaya (*Hylocereusspp*): Recursogenético de América. Pimienta B. et al. (ed.s). **Memorias del 6º Congreso Nacional y 4º Internacional sobre El conocimiento y aprovechamiento Delnopal**. Guadalajara. México. p.191-194. 1995.

PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Diferentes métodos de concentração de proteína de levedura e suas implicações nas propriedades funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v. 36, n. 2, p. 83-94, 2002.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria. **Anais...** Vacaria. Embrapa Uva e Vinho, p. 9-14, 2003.

PALACIOS, V. et al. Chemical and biochemical transformations during the industrial process of sherry vinegar aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 15, p. 4221-4225, 2002.

PALMA, A.S.A.; CARVALHO, L.F.C.P. ; GAVÓGLIO, L.C. Vinagres. In: **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International.**, Barking v.39, p.791-800, 2006.

PIMIEN-TA-BARRIOS, E.; TOMAS-VEGA, M.V. Caracterización de La variación en el peso y la composición química del fruto en variedades de pitayo (*Stenocereus queretaroensis* (Weber) Buxbaum). **Revista Sociedad Mexicana Cactología**, Cidade do México, v.38, p.82-88, 1993

POLTRONIERI, E. Alternativas para o mercado interno de pequenas frutas. In: Seminário Brasileiro sobre pequenas frutas, 1., 2003, Vacaria, RS. **Anais...** Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2003.

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

RASPOR, P.; GORANOVIĆ, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, Abingdon, v.28, p.101-124, 2008.

RATNAM, D. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J. Control Release.**, São Paulo, v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.

RHEE, M.S. et al. Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, p. 2959-2963, 2003.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Determinação de acetoína e metanol em vinagres de vinho brasileiros. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 159-168, jan./jun. 2003.

RUFATO, L. et al. **Aspectos técnicos da cultura da *Physalis***. Lages: CAV/UEDESC, 2008

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology.**, Amsterdam, v. 2489, p. 1-14, 2002.

SACHS, L. G. **Tecnologia dos produtos agropecuários: transformações de produtos vegetais.** Bandeirantes: FFALM, 1990.

SENGUN, I. Y.; KARABIYIKLI, S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. **Food Control**, São Paulo, v.22, p.647e656, 2011.

SILVA, J. A.; SOARES, L. F.; COSTA, E. L. Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão. **Revista Tecnologia de Carnes**, Campinas, v. 3 n. 1, p. 19-26. 2001.

TESFAYE, W. et al. Winevinegar: technology, authenticity and quality evaluation. **Trends in Food Science & Technology**, São Paulo, v.13, p.12–21, 2002.

UTYAMA, I. K. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica in vitro do vinagre a ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas.** , 2003. Riberão Preto. Dissertação (mestrado) Escola de Enfermagem de Riberão Preto. Universidade de São Paulo, 2003.

WARD, O. P. **Biotechnología de la fermentación: principios, procesos y productos.** ZARAGOZA: ACRIBIA, 1991.

WU, L.C.; HSU, H.W.; CHEN Y.C.; CHIU, C.C.; LIN, Y.I. HO; J.A.A. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, Oxford, v. 95, p.319–327, 2006.

WU, F.M. et al. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. **J. Food Prot.**, Des Moines, v. 63, p.568–572, 2000.

XIA, X. et al. Effects of tomato variety, temperature differential and post stem removal time on internalization of *Salmonella enterica* in tomatoes. **Journal of Food Protection**, Oxford, v. 75, n. 2, p. 279-303, 2012.

XU, Q.; TAO, W.; AO, Z. Antioxidant activity of vinegar melanoidins. **Food Chemistry**, Easton, v.102, n. 3, p. 841-849, 2007.

XU, W. et al. Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentations of Zhenjiang aromatic vinegar, **Food Microbiology**, China, n.6, v.2815, p. 1175-1181. Abr. 2011.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1

Produção e caracterização de fermentado alcoólico e vinagre de físalis e de pitaia como estratégia de aproveitamento tecnológico

RESUMO

A importância do vinagre na alimentação decorre de suas inúmeras formas de utilização, ou seja, como condimento, conferindo gosto e aroma aos alimentos em que é adicionado e como conservante, evitando o crescimento de microrganismos, sendo bastante útil como agente sanitizante, devido à sua ação bactericida. Este trabalho foi realizado com os objetivos de elaborar fermentados acéticos e caracterizá-los com base na determinação do potencial antioxidante e no seu potencial antimicrobiano. Inicialmente foi produzido o fermentado alcoólico das frutas utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 e as fermentações foram monitoradas diariamente, avaliando-se o número de células viáveis em suspensão, pH, grau Brix e realizando-se análises cromatográficas de compostos de interesse. Os teores de etanol ao final do processo fermentativo foram de 80,95 g/L (10,2 °GL), no mosto de físalis e de 84,71 g/L (10,6 °GL), no mosto de pitaia. No processo de fermentação alcoólica foi observado rendimento de 0,50 g/g, para físalis e de 0,49 g/g, para pitaia; produtividade volumétrica em etanol de 0,67 g/Lh, para físalis e de 0,39 g/Lh, para pitaia e eficiência de 98,95%, para físalis e de 95,97%, para pitaia, bem como conteúdos de polifenóis (64,56 mg GAE/100 g para físalis e 50,88 mg GAE/100g para pitaia). Na sequência foram elaborados os fermentados acéticos em biorreator de bancada, utilizando-se cultura mista de bactérias acéticas *Acetobacter aceti* (CCT 0190), *Acetobacter pasteurianus* (CCMA 0239) e *Gluconobacter oxydans* (CCMA 0350). O rendimento de ácido acético foi de 75% e a produtividade, de 0,30 g.L⁻¹.h⁻¹, para o vinagre de físalis e de 72% de rendimento e 0,46 g.L⁻¹.h⁻¹ de produtividade, para o vinagre de pitaia. Ao final da fermentação, foram mensurados 49,85 g/L de ácido acético na fermentação de físalis; já na fermentação de pitaia foram mensurados 47,14 g/L de ácido acético. Os valores de ácido acético observados nos vinagres obtidos das duas frutas estão coerentes com a legislação brasileira. Os fermentados acéticos de físalis e pitaia apresentam polifenóis (56,38 mg GAE/100 g e 36,56 mg GAE/100 g) e capacidade antioxidante (DPPH de 8,44 µmol Trolox/mL para o vinagre de físalis e 10,33 µmol Trolox/mL para o vinagre de pitaia e ABTS de 17,63 mM para o vinagre de físalis e 23,38 mM para o vinagre de pitaia). Soluções de vinagres de físalis e pitaia a 6,25% inibiram o crescimento *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*, mostrando que os vinagres elaborados neste estudo apresentaram atividade antimicrobiana. Em conclusão, o vinagre pode ser produzido com sucesso a partir do fermentado alcoólico de físalis e pitaia.

Palavras-chave: Fermentação Alcoólica. Fermentação acética. Atividade Antioxidante. Antimicrobiano.

ABSTRACT

The importance of vinegar in our throughout their numerous forms of use, namely as a condiment, giving taste and flavor to foods in which it is added and as a preservative by preventing the growth of microorganisms, is useful as sanitizing agent, due to its bactericidal action. This work was conducted with the objective of preparing fermented acetic and characterize them based on the determination of the antioxidant potential and its antimicrobial potential. Initially was produced alcoholic fermentation of the fruits, using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 and the fermentations were monitored daily, measuring the number of viable cells in suspension, pH, Brix and carrying out analyzes chromatographic compounds of interest. The ethanol concentration at the end of the alcoholic fermentation process, were 80.95 g.L⁻¹ (10.2 °GL) in the físalis must and 84.71 g.L⁻¹ (10.6 °GL) in the pitaya must. In the fermentation process was observed yield of 0.50 g / g for físalis and 0.49 g / g for dragon pitaya; ethanol volumetric productivity of 0.67 g / Lh to físalis and 0.39 g / Lh to pitaya and efficiency of 98.95% to físalis and 95.97% to pitaya, as well as content of polyphenols (64.56 mg GAE / 100 g for físalis and 50.88 mg GAE / 100g to pitaya). In sequence, the acetic fermentation were prepared in bioreactor bench, using mixed culture of acetic bacteria *Acetobacter aceti* (CCT 0190), *Acetobacter pasteurianus* (CCMA 0239) and *Gluconobacter oxydans* (CCMA 0350). The yield of acetic acid was 75% and productivity of 0.30 gL⁻¹.h⁻¹ for físalis vinegar and 72% yield and 0.46 gL⁻¹.h⁻¹ productivity for pitaya vinegar. At the end of fermentation were measured 49.85 g / L acetic acid in the fermentation físalis; in the pitaya fermentation were measured 47.14 g / l acetic acid. Acetic acid values observed in vinegars obtained from the two fruits are consistent with Brazilian law. The físalis and pitaya fermented acetic present polyphenols (56.38 mg GAE / 100g 36.56 mg GAE / 100 g) and antioxidant activity (DPPH 8.44 micromol Trolox / ml for físalis vinegar and 10.33 micromol Trolox / ml for pitaya vinegar and 17.63 mM ABTS for físalis vinegar and 23.38 mM for the pitaya vinegar). Físalis and pitaya vinegar solutions to 6.25% inhibited the growth *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*, showing that the vinegars produced in this study showed antimicrobial activity. In conclusion, vinegar can be successfully produced from alcoholic fermented físalis and pitaya.

Keywords: Alcohol Fermentation. Acetic Fermentation. Antioxidant Activity. Antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

Apreciado no mundo inteiro, o vinho está cada vez mais presente na mesa dos brasileiros (SANTOS et al., 2005). Tradicionalmente, os vinhos são obtidos da fermentação alcoólica do mosto de uva, que é utilizada como matéria-prima. No entanto, diversos pesquisadores já utilizam diferentes frutas tropicais e exóticas para a produção e a caracterização de bebidas fermentadas. Para a produção desses fermentados alcoólicos são empregados os mesmos processos da fabricação do vinho de uvas, variando as frutas das quais se extraem os açúcares fermentescíveis.

Aliados ao sabor agradável, os vinhos de frutas podem conter uma variedade de compostos antioxidantes que são importantes compostos bioativos. A produção de fermentados de frutas que apresentem compostos fenólicos pode ser interessante, pois há muitas evidências epidemiológicas de que dietas ricas em frutas e vegetais apresentam efeitos vantajosos para a saúde (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

O vinagre é um produto de fácil acesso no Brasil, porém, pouco valorizado comercialmente, devido, em parte, ao desconhecimento, pelo consumidor, de suas propriedades funcionais (ADAMS, 1998). São encontrados na literatura alguns trabalhos que destacam as propriedades bioativas do vinagre e os benefícios à saúde que o produto pode proporcionar.

A importância do vinagre na alimentação decorre de suas inúmeras formas de utilização, ou seja, como condimento, conferindo gosto e aroma aos alimentos aos quais é adicionado, e também como conservante, sendo bastante útil como agente amaciante de carnes temperadas e legumes em conservas. Além disso, é muito empregado como agente sanitizante no preparo de alimentos, devido à sua ação bactericida (GRANADA et al. 2000).

O vinagre pode se originar de várias frutas, tais como amora, banana, abacaxi, laranja, limão, maçã, pêra, figo, ameixa, caqui, pêssego, melancia, mexerica, jabuticaba, caju, morango e uva (MORETTO, 1988; ADAMS, 1998). Vinagres de frutas são considerados superiores, em qualidades sensoriais e nutritivas, quando comparados a outros tipos de vinagres, por possuírem vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos oriundos da fruta e da fermentação alcoólica (LU et al., 1999; AQUARONE et al., 2001)

Durante a última década, a físalis e a pitaia se tornaram objeto de estudo em muitos países, devido ao potencial como frutíferas exóticas. De acordo com Fontana et al. (2000), os frutos de físalis apresentam compostos bioativos, o que é devido ao seu expressivo conteúdo de constituintes químicos, como flavonoides simples ou glicosilados, carotenoides, ácido ascórbico e alcaloide que contribuem para a captura de radicais livres atuando como antioxidantes. Wu (2006), em seu estudo, encontrou quantidades consideráveis de compostos fenólicos na polpa e nas cascas da pitaia. Nos últimos anos tem se incentivado o consumo de alimentos que apresentem atividade antioxidante para se prevenir o estresse oxidativo e o surgimento de patologias associadas a este. Assim, seria interessante a produção de vinagre que apresentasse substâncias antioxidantes com capacidade de inibir a oxidação em sistemas biológicos.

Segundo Budak e Guzel-Seydim (2010), a presença de compostos fenólicos em vinhos e vinagres tem efeito positivo para a saúde, por apresentarem efeito antioxidante.

Além da presença de compostos polifenólicos, os vinagres de fruta apresentam uma série de ácidos orgânicos, dos quais o principal é o ácido acético. Foi comprovado em estudos o efeito bactericida e bacteriostático desses ácidos (SILVA et al., 2007).

De acordo com Medina et al. (2007), o vinagre reduziu a contagem de *Salmonella enteritidis* e *E.coli*. Outros autores estudaram o vinagre (ácido

acético) pela sua eficácia na remoção de patógenos de frutas e legumes frescos (RHEE et al, 2003; WU et al., 2000). Assim, a elevada quantidade de ácido acético do vinagre se tornou muito eficaz na prevenção de intoxicação alimentar bacteriana.

Visando um melhor aproveitamento das frutas de físalis e pitaia, objetivou-se, no presente trabalho, elaborar fermentados alcoólicos e acéticos e caracterizá-los, com base na determinação do potencial antioxidante, no seu potencial antimicrobiano e na aceitabilidade sensorial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coletas das frutas

Os frutos de *Physalis* e *Hylocereus* foram adquiridos no Ceasa de Campinas, SP, tendo sido selecionados somente aqueles sem injúria física, podridão ou contaminação visível. Após a seleção, os frutos foram lavados em água clorada a 5 ppm, para eliminar os possíveis microrganismos existentes, e enxaguados em água corrente. A polpa foi obtida por meio da trituração do fruto íntegro em multiprocessador Philips Walita RI 1858 (Figura 1). Em seguida, a polpa obtida foi armazenada em sacos plásticos e congelada, sem aditivo químico.



Figura 1 Obtenção das polpas de físalis (A) e pitaia (B)

2.2 Análises bromatológicas da polpa

2.2.1 Umidade

O teor de água foi determinado pelo método gravimétrico em estufa, a 65 °C, até massa constante e os resultados expressos em porcentagem, conforme as normas analíticas da AOAC (1990), com algumas modificações. Para essa análise, aproximadamente 2,0 g de amostra foram pesados em cadinho previamente tarado e seco, em triplicata. O cadinho com a amostra seca foi levado à estufa, a 65 °C, por 4 horas. Após esse intervalo, as amostras foram retiradas da estufa e levadas para o dessecador, até atingirem temperatura ambiente, quando foram pesadas. Essa operação foi repetida até atingir massa constante. O teor de água foi calculado pela seguinte equação:

Umidade (%)= (peso amostra integral – peso amostra seca/ amostra integral) x 100.

2.2.2 Cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada segundo as normas analíticas do AOAC (1990), pela incineração da amostra em mufla, a 550 °C, seguida pelos processos de resfriamento em dessecador e pesagem até a amostra atingir peso constante. Para essa análise, aproximadamente 2,0 g de amostra foram pesados em cadinho, previamente aquecidos em mufla, a 550 °C, por 30 minutos, resfriados em dessecador até a temperatura ambiente, pesados e previamente tarados, em triplicata. Os cadinhos com as amostras foram levados para a mufla a 550 °C, até a completa incineração das amostras e, em seguida, foram acondicionados em dessecador até atingirem temperatura ambiente,

quando foram pesados. Essa operação foi repetida até a obtenção de peso constante. O teor de cinzas foi calculado pela seguinte equação:

$$\% \text{ cinzas} = (\text{g de cinzas} / \text{g amostra}) \times 100 \text{ g de amostra}$$

2.2.3 Proteína

A concentração de proteína bruta foi determinada pela quantificação de nitrogênio total da amostra, utilizando método de Kjeldahl, seguindo as normas analíticas do AOAC (1990). Para essa análise, aproximadamente 0,3 g da amostra foram pesados em um tubo de digestão previamente tarado, em triplicata. Em cada tubo com amostra foram adicionados 3 g de mistura catalítica (90% de sulfato de potássio (K_2SO_4) + 10% de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Os tubos foram colocados em bloco digestor, iniciando-se o aquecimento com a elevação da temperatura de 50 °C/30 min, até atingir 400 °C. Ao alcançar esta temperatura, as amostras permaneceram no bloco digestor até ficarem incolores. Então, os tubos foram retirados do bloco digestor até que fosse atingida a temperatura ambiente. Posteriormente, 2 mL de água destilada foram adicionados em cada tubo. As amostras foram alcalinizadas com a adição de 25 mL de solução de hidróxido de sódio a 40% (NaOH) e destiladas em destilador de nitrogênio (aparelho de Kjeldahl). Frascos de erlenmeyer contendo 10 mL de solução de ácido bórico receberam a solução destilada, até completar um volume de 75 mL e, então, titulou-se com solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,1N. O teor de proteína foi calculado pela equação: % proteína = $V \times N \times 1,40 \times 6,25 / P$, em que V = volume de HCl gasto na titulação; N = normalidade do HCl usado; 1,40 = equivalente miligrama do N (14); P = peso da amostra.

2.2.4 Extrato etéreo

A extração dos lipídios foi realizada utilizando-se éter como solvente orgânico e aparelho Soxhlet, considerando as normas analíticas descritas pela AOAC (1990). Para tal, pesaram-se cerca de 2 g de amostra seca em um cartucho celulósico. Os cartuchos com amostra seca foram adicionados em reboiler previamente seco e tarado e, posteriormente, introduzidos no extrator Soxhlet e colocados sob refluxo com éter por 2 horas. Em seguida, os reboiler mais extrato etéreo foram removidos do extrator e secos em estufa, a 105 °C, até peso constante, depois levados para o dessecador até atingirem temperatura ambiente, quando foram, então, pesados. O teor de lipídeos foi calculado pela equação $\% EE = (A - B) \times 100$, em que EE= extrato etéreo; A = peso da amostra e B = peso da amostra desengordurada.

2.2.5 Fibra bruta

A determinação do conteúdo de fibra alimentar total seguiu a metodologia descrita pela as Normas Analíticas do AOAC (1990), com adaptações. Primeiramente, pesaram-se 0,5 g de amostra seca e desengordurada em tubo para digestão. Adicionaram-se ao tubo 17,5 mL de ácido acético 70%, 0,5 g de ácido tricloracético e 1,2 mL de ácido nítrico. Fecharam-se os tubos com varetas para refluxo, deixando-os em refluxo por 30 minutos a partir da ebulição. Depois, o conteúdo foi filtrado a vácuo em cadinho de fundo poroso forrado com lã de vidro, previamente seco e tarado. O resíduo, então, foi lavado com água destilada quente. Colocou-se o cadinho contendo a fibra em estufa a 105 °C, até peso constante. Depois de frio colocou-se o cadinho com a fibra em dessecador para pesagem final. O teor de fibra bruta foi calculado por % fibra

bruta = $\{[(\text{peso cadinho} + \text{fibra}) - (\text{peso cadinho})] / (\text{peso inicial da amostra})\} \times 100$.

2.3 Elaboração dos vinagres

Os mesmos procedimentos experimentais foram utilizados para as duas frutas avaliadas neste estudo.

2.3.1 Microrganismos

Para a etapa de fermentação alcoólica dos mostos foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 (disponível comercialmente na forma peletizada sob nome comercial LNF CA 11®).

Na etapa de acetificação dos fermentados alcoólicos, para a obtenção dos respectivos vinagres, foram utilizadas uma estirpe de *Acetobacter aceti* CCT 0190 (Coleção de Culturas Tropical André Tosello tropical), uma estirpe de *Acetobacter pasteurianus* CCMA 0239 (Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola da UFLA) e uma estirpe de *Gluconobacter oxidans* CCMA 0350 (Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola da UFLA), em cultura mista com população final de 10^9 UFC/mL

2.3.2 Preparo do inóculo para as fermentações alcoólicas e acéticas

2.3.2.1 Levedura

A levedura *S. cerevisiae* CCMA 0200 liofilizada foi previamente hidratada antes da adição ao mosto de fermentação. Visando atingir uma população celular de 10^7 cel/mL, foram utilizados 5 g da levedura, reidratada em 50 ml de água destilada estéril, por 30 minutos, a 38 °C. Posteriormente, a

levedura foi transferida para 50 mL de meio YEPG (em g/L: extrato de levedura, 10,0; peptona bacteriológica, 20,0; glicose, 20,0) e incubada, a 28 °C e 120 rpm em agitador orbital (shaker), por 24 horas (Figura 2). Em seguida, a levedura foi centrifugada duas vezes e lavada em água destilada. Depois das lavagens, utilizou-se o mosto para ressuspender as células e procedeu-se à inoculação a uma população inicial de 10^7 células.mL⁻¹.



Figura 2 Preparo do inóculo para as fermentações alcoólicas

2.3.2.2 Bactérias do ácido acético

As culturas de *Acetobacter aceti* (CCT 0190), *Acetobacter pasteurianus* (CCMA 0239) e *Gluconobacter oxidans* (CCMA 0350) foram reativadas em meio YEPG (em g/L; extrato de levedura, 10,0; peptona bacteriológica, 20,0; glicose, 20,0). Para o pré-cultivo, 3 mL das culturas foram transferidos para 150 mL de caldo YEPG, em frascos Erlenmeyer. Os frascos foram incubados a 28 °C e 150 rpm, em agitador orbital (*shaker*), por 48 horas. Após este período, 50 mL desse pré-cultivo foram transferidos para um novo Erlenmeyer contendo 100 mL de YEPG e incubados a 28 °C e 150 rpm, em agitador orbital (*shaker*); os outros 100 mL do pré-cultivo foram centrifugados e guardados em água

peptonada na geladeira. Essa etapa de propagação do inóculo se repetiu até a população de 10^9 UFC/mL ser alcançada (Figura 3).

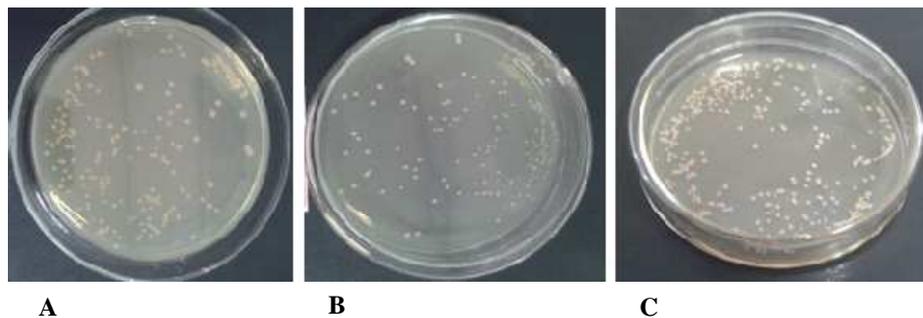


Figura 3 Bactérias do ácido acético: *Gluconobacter oxidans* (CCMA 0350) (A), *Acetobacter aceti* (CCT 0190) (B) e *Acetobacter pasteurianus* (CCMA 0239) (C)

2.3.3 Preparo do mosto para fermentação alcoólica

Para o preparo do mosto, as polpas foram descongeladas, por 24 horas, à temperatura ambiente (aproximadamente $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os mostos de físalis e pitaia foram preparados de acordo com as metodologias propostas por Dias et al. (2007) e Dias, Schwan e Lima (2003), com modificações. Para eliminar possíveis microrganismos nas polpas realizou-se a técnica do vapor fluente, no qual as polpas foram colocadas em frascos de vidros e deixadas na autoclave por 15 minutos. Posteriormente, o grau Brix foi aferido por meio de um refratômetro (SP Labor, faixa de medição 0,0 a 53,0% Brix, modelo PAL-1- ATAGO). A chaptalização do mosto foi realizada para obter uma bebida cujo teor alcoólico estivesse entre $8\text{ }^{\circ}\text{GL}$ e $10\text{ }^{\circ}\text{GL}$. As polpas de físalis e pitaia foram então corrigidas com solução de sacarose comercial (açúcar cristal). Em geral, a cada 18 g de sacarose adicionados a um volume final de 1 L, eleva-se o $^{\circ}\text{Brix}$ do mosto em, aproximadamente, uma unidade. As polpas das frutas foram corrigidas na proporção de um volume de polpa para um volume de solução de

sacarose, ao valor de 20 °Brix. Não houve necessidade de correção do pH do mosto, visto que o mosto de físalis apresentou valor de 3,5 e o mosto de pitaia, de 4,49. As fermentações foram realizadas em triplicata, cada uma com, aproximadamente, 1,2 L de mosto.

2.3.4 Fermentação alcoólica

Os processos fermentativos foram conduzidos em erlenmeyers de vidro com capacidade de 2 L (Figura 4). Os mostos corrigidos foram inoculados com células de *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 previamente obtidas. A população celular em cada litro de mosto foi de 10^7 cel/mL.



Figura 4 Erlenmeyers de vidro com mosto de físalis (A) e pitaia (B)

Os frascos foram incubados à temperatura de 22 °C (estufa tipo BOD). O encerramento da fermentação foi considerado quando houve a estabilização do consumo de açúcares, que é medido pelo °Brix. Durante a fermentação foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de células viáveis, que foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer para contagem em microscópio óptico (Dias et al., 2007); teor de sólidos solúveis totais, que foi determinado por leitura direta em refratômetro digital, previamente calibrado com água destilada (os resultados foram expressos em °Brix, de acordo com a técnica da AOAC,

2000) e mensuração do pH, que foi realizada empregando-se pHmetro digital com eletrodo de vidro, conforme as recomendações da Association Of Official Analytical Chemisty - AOAC (2000).

Ao final da fermentação, as bebidas foram filtradas a vácuo em frasco tipo Kitassato, de 4 litros de volume, ao qual foi acoplado um funil tipo Büchner, utilizando filtro de celulose (Dias et al., 2007). Terminada a filtração, as bebidas foram centrifugadas e acondicionadas em garrafas de vidro âmbar e armazenadas sob refrigeração, a 4 °C. Nos fermentados alcoólicos obtidos foram determinados, além dos valores de pH, sólidos solúveis, células viáveis em suspensão, os conteúdos de álcoois (etanol e glicerol), carboidratos (sacarose, glicose e frutose) e ácidos orgânicos (acético, láctico, málico, succínico, cítrico), compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e análise sensorial.

2.3.5. Parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica

O desempenho das fermentações foi medido pela conversão de fatores utilizando-se o cálculo da conversão de substrato (g.g-1) em etanol (Yp/s), glicerol (Yg/s), produtividade volumétrica de etanol (Qp) e eficiência de conversão (Ef) (DUARTE et al., 2010b).

As equações utilizadas foram as seguintes:

$$Y_{p/s} = (P_f - P_i) / (S_i - S_f);$$

$$Y_{g/s} = (g_f - g_i) / (S_i - S_f);$$

$$Q_p = (P_f - P_i) / t_f;$$

$$E_f = (Y_{p/s} / 0,51) \times 100;$$

em que P_i = concentração inicial de etanol; P_f = concentração final de etanol; S_i = concentração inicial de substrato e S_f = concentração final de substrato; g_i =

concentração de glicerol inicial; g_f = concentração de glicerol final e t_f = tempo final da fermentação.

2.3.6 Acetificação (fermentação acética)

Para a produção dos vinagres foram utilizados o fermentado de físalis e o de pitaia, obtidos no item anterior. O fermentado foi suplementado com Acetozyn®, composto de nutrientes auxiliares do crescimento das bactérias ácido-acéticas.

A fermentação acética foi conduzida pelo processo submerso realizado em fermentador de bancada (Biostat® A, Plus) com cuba de 5 litros, sendo utilizado um volume de trabalho de 1 litro (Figura 5).

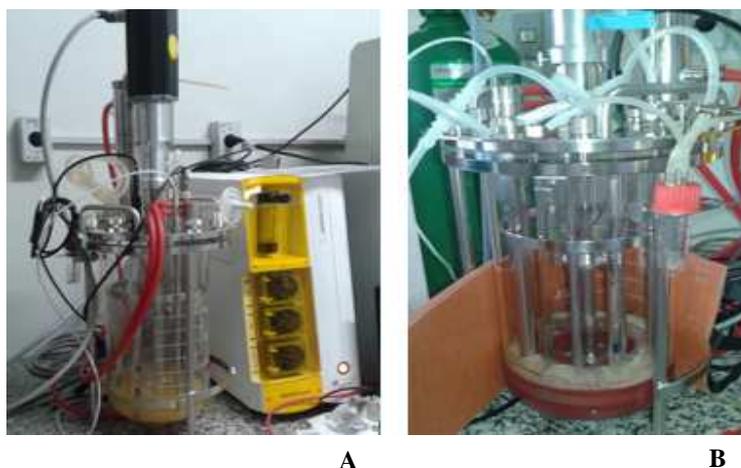


Figura 5 Fermentação acética de físalis (A) e pitaia (B)

A fermentação acética foi conduzida empregando-se cultivo misto de *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxidans*. Antes de iniciar a fermentação acética foi feita a adaptação dessas bactérias ácido-acéticas

cultivadas em meio YEPG. Assim, as bactérias foram transferidas para 100 mL de mosto fermentado alcoólico de físalis e de pitaia suplementado com Acetozyn® e mantidas em incubadora *shaker*, por 24 horas, a 30 °C, com agitação de 150 rpm para a obtenção do pé-de-cuba. Posteriormente, o pé-de-cuba foi transferido para o biorreator contendo 900 mL dos fermentados alcoólicos produzidos. A população final das bactérias no biorreator foi de 10^9 UFC/mL. A fermentação acética foi conduzida a 30 °C, com agitação de 150 rpm, e aeração feita por uma bomba de aquário.

Durante a fermentação acética, foram realizadas coletas em intervalos de 24 horas, em triplicata, para análise de acidez e teor alcoólico.

A fermentação acética foi considerada encerrada quando o vinagre apresentou teor alcoólico abaixo de 1,0% de etanol (v/v) e 4% de teor mínimo de ácido acético (BRASIL, 1999), verificado com o auxílio do cromatógrafo líquido (HPLC). Nos vinagres obtidos foram determinados, além dos valores de pH, acidez, teor de etanol e ácido acético, os conteúdos de ácidos orgânicos (lático, málico, succínico, cítrico), compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, antimicrobiano e análise sensorial.

2.3.7 Tratamento do vinagre

Os vinagres obtidos foram filtrados, centrifugados e engarrafados.

2.3.8 Rendimento da fermentação acética

O rendimento GK foi calculado a partir dos teores de etanol e ácido acético nos fermentados alcoólicos e acéticos. Tem-se que a soma da concentração do etanol (% v/v) e do ácido acético (% m/v) é igual à

concentração total (CT) ou GK, do alemão *Gesammte Konzentration* (Adams, 1998).

$$\text{Rendimento GK} = (\text{GK final} / \text{GK inicial}) \times 100$$

em que

GK final = etanol final + ac. acético final

GK inicial = etanol inicial + ac. acético inicial

O rendimento em ácido Y_{ácido} foi calculado segundo Lima et al (2001), a partir da equação a seguir. Lima et al (2001) descreveram o rendimento como sendo a relação entre a quantidade de produto formado pela concentração total de substrato e produto.

$$Y_{\text{ácido}} = \% \text{acidez do produto} / \% \text{CT do fermentado alcoólico}$$

em que

Y ácido: rendimento em ácido

% acidez do produto: concentração de ácido produzido (%)

% CT do fermentado alcoólico: concentração total do fermentado alcoólico (% (v/v) de etanol + % (m/v) de ácido acético)

A produtividade (P) foi calculada pela quantidade produzida de ácido acético em relação ao tempo ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

$P = \text{quantidade de ácido acético (g)} / [\text{volume de fermentado (L)} \times \text{tempo de fermentação (h)}]$

2.3.9 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) dos vinagres

As cepas bacterianas utilizadas foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFLA, sendo elas *Escherichia coli* 25922; *Listeria monocytogenes* 19117; *Staphylococcus aureus* 8702 e *Salmonella enteritidis* S64. As culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL, pH 7,0). As culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e reativadas inoculando-se alíquotas de 100 µL em tubos contendo 10 mL de caldo *brain heart infusion* (BHI) e incubadas, a 37 °C/24 horas. A contagem foi padronizada em 10⁸ UFC/mL, para a execução dos experimentos.

A concentração mínima inibitória (CIM) dos vinagres de físalis pitaia e comercial foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003) com adaptações.

Para tanto, soluções de TSA (Tryptic Soy Agar) acrescidas de 0,5% de Tween 80 e de vinagres foram obtidas nas seguintes concentrações (%): 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 (v/v). Foram adicionados nas cavidades 150 µL das soluções e inoculados 10 µL da cultura padronizada. As placas foram vedadas e incubadas a 37 °C/24 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA e incubadas, a 37 °C/24 horas e determinada a concentração de vinagre capaz de matas as células de *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, determinando-se, assim, a mínima concentração bactericida dos vinagres testado.

O experimento ocorreu em triplicata e três repetições e utilizou-se controle negativo contendo TSA acrescido de 0,5% de Tween 80 e composto, sem inóculo.

2.3.10 Análises cromatográficas

2.3.10.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

As amostras coletadas a cada 24 horas dos processos fermentativos foram submetidas a análises cromatográficas para a determinação dos seguintes compostos: álcoois (etanol, metanol e glicerol), carboidratos (sacarose, glicose e frutose) e ácidos orgânicos (acético, láctico, málico, succínico, cítrico e tartárico).

Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corporation Japão), equipado com detectores de índice de refração (modelo RID-10A) e de ultravioleta (modelo SPD-10Ai). A coluna utilizada foi o modelo Shimpack SCR-101H (Shimadzu). Carboidratos e álcoois foram detectados pelo detector de índice de refração e a coluna à temperatura 30 °C. A determinação dos ácidos orgânicos foi realizada pelo detector de ultravioleta, com comprimento de onda selecionado em 210 nm e a coluna foi operada à temperatura de 50 °C. A fase móvel foi o ácido perclórico na concentração 100 mM, com pH ajustado para 2,1, a um fluxo de referência de 0,6 mL.min⁻¹. A quantificação foi realizada a partir da comparação com curvas de calibração, determinadas utilizando-se padrões certificados da marca Supelco. As análises foram realizadas segundo a metodologia de Duarte et al. (2009).

2.3.11 Avaliação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante

2.3.11.1 Preparo dos extratos para determinações de compostos fenólicos e atividade antioxidante

Para a obtenção do extrato da polpa, foi utilizada a metodologia de Larrauri, Ruperez e Saura-Calixto (1997) com adaptações. Pesaram-se 4,0 g de amostra, adicionando-se 40 mL de metanol 50%, homogeneizando-se e deixando-se em repouso por 40 minutos, à temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra a 15.000 rpm, durante 15 minutos, transferindo o sobrenadante para um balão volumétrico de 100 mL. A partir do resíduo da primeira extração, foram adicionados 40 mL de acetona 70%, homogeneizando-se e deixando-se em repouso por 60 minutos, à temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente a 15.000 rpm, durante 15 minutos, transferindo então o sobrenadante para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e completando-se o volume para 100 mL com água destilada.

2.3.11.2 Compostos fenólicos

A concentração de fenólicos totais foi determinada no fermentado alcoólico, no vinagre e na polpa, conforme metodologia de Waterhouse (2001), empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Em resumo, 0,5 mL de cada amostra foram adicionados aos tubos contendo 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10%. Após 8 minutos, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio a 4%. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos foi medida espectrofotometricamente, na faixa de absorção de 750 nm. O cálculo do teor de fenólicos foi realizado a partir da

equação da reta obtida da curva padrão do ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g da amostra (mgEAG.100g⁻¹).

2.3.11.3 Determinação da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH

A capacidade sequestrante de radicais livres DPPH (1,1-difenil- 2-picril-hidrazina) foi analisada conforme a metodologia descrita pela Embrapa (RUFINO et al., 2007). Alíquotas dos fermentados (amostras) foram diluídas para se obter três diferentes concentrações. A 0,1 mL de cada amostra foram acrescentados 3,9 mL de solução metanólica do radical livre DPPH 0,06 mM. Após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura da absorbância em 515 nm, contra um branco específico. Como controle, utilizaram-se 3,9 mL de solução metanólica de DPPH 0,06 mM e 0,1 mL de metanol. Seis concentrações diferentes de Trolox (0,02 mM, 0,06 mM, 0,1 mM, 0,14 mM, 0,18 mM e 0,22 mM) foram preparadas nas mesmas condições da amostra, sendo, portanto, misturados 0,1 mL de cada concentração de solução de Trolox e 3,9 mL de solução DPPH (0,025 g/L) e utilizadas para a construção de uma curva de calibração com leituras no tempo zero. Os resultados foram expressos como equivalentes μmol de Trolox equivalente (TEAC) por g de amostra. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.3.11.4 Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método de captura do radical ABTS^{•+}

A análise foi realizada de acordo com o Protocolo de Análise para Determinação da Atividade Antioxidante Total em frutas, pela captura do radical livre ABTS - Embrapa (RUFINO et al., 2007b).

Inicialmente, foram preparadas soluções de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (140 mM). O radical ABTS^{•+} foi obtido a partir da reação de 5 mL da solução de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio mantida ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, por 16 horas. Diluiu-se 1 mL desta mistura em álcool etílico absoluto até a obtenção de absorvância de 0,700 nm±0,05 nm a 734 nm de comprimento de onda, sendo utilizada somente no dia da análise.

Em tubo de ensaio foram adicionados 30 µL da amostra e 3 mL da solução de ABTS^{•+}; após agitação em vortex, os tubos foram deixados ao abrigo da luz por 6 minutos. As leituras foram realizadas a 734 nm em triplicata e os resultados obtidos por correlação com a curva padrão. Etanol absoluto foi utilizado como branco para a leitura das amostras. O mesmo procedimento reacional foi utilizado para a construção de curva padrão, sendo preparadas diferentes concentrações de trolox (100 µM, 500 µM, 1000 µM, 1500 µM e 2000 µM). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µmol trolox/g polpas e µmol/mL, para vinho e vinagre.

2.3.11.5 Determinação da atividade antioxidante total no sistema β-caroteno/ácido linoleico

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método desenvolvido por Marco (1968), com pequenas modificações (HASSIMOTTO; GENOVESE;

LAJOLO, 2005), por meio da cooxidação entre o ácido linoleico e o β -caroteno. Para o preparo da solução reativa, alíquotas de 160 μ L de uma solução de β -caroteno (80 mg β -caroteno em 1 mL clorofórmio) foram misturadas com 160 μ L de ácido linoleico, 1 mL de clorofórmio e 800 μ L de Tween 40. Posteriormente, o clorofórmio foi evaporado até secagem completa. Após a evaporação do clorofórmio, foram adicionados, aproximadamente, 500 mL de água destilada tratada previamente com oxigênio durante 30 minutos. A solução deve estar límpida e apresentar densidade óptica entre 0,6 e 0,7. Para a reação de oxidação, uma alíquota 0,4 ml das amostras foi adicionada a 5 ml da mistura reativa em tubos de ensaio. Em seguida, homogeneizaram-se os tubos de ensaio em agitador que foram mantidos em banho-maria, a 40 °C. Realizou-se a primeira leitura (470 nm) após 2 minutos de efetuada a mistura e, depois, em intervalos de 15 minutos até 120 minutos, a auto-oxidação, a 40 °C, por 2 horas. Foram utilizados metanol, como controle negativo e antioxidante Trolox, como controle positivo. Foram realizadas análises em triplicata para cada amostra. A atividade antioxidante foi calculada pelo desaparecimento relativo do β -caroteno no sistema, correlacionando-se com o controle negativo (sem antioxidante), estabelecendo, dessa maneira, a porcentagem de inibição da oxidação, utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(A_{470(Ci)} - A_{470(Cf)}) - (A_{470(Ai)} - A_{470(Af)})}{(A_{470(Ci)} - A_{470(Cf)})} \times 100$$

em que $A_{470(Ci)}$ e $A_{470(Cf)}$ referem-se à absorbância inicial e final do controle e $A_{470(Ai)}$ e $A_{470(Af)}$ referem-se à absorbância inicial e final da amostra. Foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações de Trolox e suas

respectivas porcentagens de inibição. Os resultados foram expressos como μ moles equivalentes de Trolox/g de amostra.

2.3.12 Análise sensorial

As avaliações sensoriais foram realizadas, por 50 provadores não treinados, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Foi fixado, como condição mínima para participar do teste, que o provador fosse consumidor de bebidas alcoólicas e vinagres. Os fermentados alcoólicos e os fermentados acéticos foram avaliados em cinco parâmetros (cor, viscosidade, aroma, sabor e impressão global), acompanhados por escala de nove categorias: 1- desgostei extremamente; 2- desgostei muito; 3- desgostei moderadamente; 4- desgostei ligeiramente; 5- indiferente; 6- gostei ligeiramente; 7- gostei moderadamente; 8- gostei muito e 9- gostei extremamente. Os provadores foram questionados, ainda, sobre os aromas e os sabores detectáveis na bebida (Moraes, 1993). Foi realizado também a análise *checkall-that-apply*, CATA (ARES et al., 2010), que consiste numa lista de palavras ou frases na qual os respondentes podem selecionar todas as que considerem apropriadas para descrever o produto. Os resultados do teste CATA foram avaliados pela frequência (%) em que foram citados.

2.3.13 Análises estatísticas

ANOVA e teste de Scott-Knott foram realizados utilizando-se o software SISVAR 5.1 (Lavras, Brasil).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química da polpa de físalis e pitaia

Na Tabela 1 estão descritos os valores obtidos na caracterização físico-química da polpa de físalis e pitaia.

Tabela 1 Composição físico-química do suco integral (polpa sem bagaço) dos frutos de físalis e pitaia

Parâmetros analisados	Físalis	Pitaia
Umidade (%)	86,41±0,11	90,35±0,21
Lipídeo (%)	0,49±0,07	0,29±0,08
Proteína bruta (%)	0,85±0,03	0,84±0,01
Cinzas (%)	1,10±0,05	0,52±0,01
Fibra bruta (%)	0,41±0,03	0,87±0,05
° Brix	12±0,32	8±0,10
Ph	3,5±0,00	4,49±0,01
Acidez titulável (mg ácido cítrico. 100 g⁻¹ fruta)	1,1±0,00	0,30±0,01

Em relação ao teor de umidade, o fruto físalis apresentou elevado valor, 86,41 g.100 g⁻¹, semelhante ao encontrado por Ramadan; Moersel, (2007), de 92,97 g.100 g⁻¹; por Licodiedoff; Koslowski; Ribani (2013), de 82,66 g.100 g⁻¹ e por Zhang et al. (2013), 80,97 g.100 g⁻¹.

O fruto de físalis apresentou baixos teores de lipídeos (0,49 g.100 g⁻¹), proteínas (0,85 g.100 g⁻¹) e de cinzas (1,10 g.100 g⁻¹), como os valores relatados por Mendoza; Rodríguez; Millán (2012) que reportaram para lipídeos, 0,40 g.100 g⁻¹; para proteínas, 1,10 g.100 g⁻¹ e, para cinzas, 1,0 g.100 g⁻¹. O valor encontrado para a fibra bruta foi de 0,41 g.100 g⁻¹.

O menor conteúdo fibra encontrado nas amostras empregadas no presente trabalho pode estar relacionado ao fato de que foi caracterizada a polpa

da fruta após trituração da amostra em multiprocessador, ou seja, com remoção das sementes e cascas.

O teor de sólidos solúveis presentes na polpa de físalis foi de 12 °Brix, semelhante ao relatado por Licodiedoff; Koslowski; Ribani (2013), que encontraram sólidos solúveis de 12,88 ° Brix na mesma fruta.

Em relação ao pH, o fruto de físalis apresentou 3,5, próximo ao descrito por Castro; Rodriguez; Vargas, (2008) que relataram pH de 3,6.

O valor encontrado de acidez titulável para físalis foi de 1,1 mg.100 g⁻¹, resultado inferior ao relatado por Licodiedoff; Koslowski; Ribani, (2013), de 1,51 mg.100 g⁻¹, no mesmo fruto.

Em relação aos frutos de pitaia vermelha (*Hylocereus polyrhizus*), as polpas analisadas neste estudo apresentaram alto teor de umidade, 90,35%. Em pitaias do gênero *Hylocereus*, Canto et al. (1993) encontraram 89,4% de umidade e Abreu et al. (2012) encontraram 85,52% de umidade. Mahatanatawee et al. (2006) reportaram valores de umidade de 83,6% para polpa de pitaia vermelha.

O teor de lipídio encontrado para o fruto de pitaia foi de 0,29%, inferior ao encontrado por Abreu et al. (2012) na polpa de *Hylocereus polyrhizus*, de 0,36%. Jamilah et al. (2011) obtiveram valores de extrato etéreo de 0,10 para casca de pitaia. O resultado para proteínas foi de 0,84%, inferior (1,06% de proteína) ao encontrado por Abreu et al. (2012). O teor de cinzas das amostras foi de 0,52%, superior ao encontrado por Abreu et al. (2012), que relataram 0,36% e inferior ao reportado por Rodrigues (2010), de 0,80 g 100g⁻¹, na polpa. Para a fibra bruta em pitaia, foram encontrados 0,87 g.100g⁻¹. Rodrigues (2010) obteve valores de 0,65 g 100g⁻¹ na polpa da pitaia do cerrado.

Segundo Chitarra; Chitarra (2005), baixos teores de cinzas, proteínas e lipídeos são características comuns para a maioria dos frutos.

Já os sólidos solúveis presentes na polpa de pitaia foi 8° Brix, o que está de acordo com os estudos de Vaillant et al.(2005), que afirmaram que os sólidos solúveis em polpas de pitaias variam de 7 a 11°Brix. Chitarra e Chitarra (2005) reportaram que as frutas, no geral, quando maduras, apresentam entre 8 a 14 °Brix de sólidos solúveis.

O fruto de pitaia apresentou pH de 4,49, bem semelhante ao encontrado por Stintzing et al. (2004), 4,4 e próximo do que foi relatado por Lima et al. (2001) para a mesma espécie, 4,85.

Para acidez titulável no fruto de pitaia do presente estudo foi encontrado teor de 0,30 mg.100 g⁻¹ de ácido cítrico, resultado superior ao encontrado por Lima et al. 2010, 0,13 mg.100 g⁻¹, para a mesma espécie de pitaia e semelhante ao relatado por Abreu et al. (2012), de 0,24 mg.100 g⁻¹.

3.2 Determinação de compostos bioativos nas polpas das frutas

No presente trabalho foram utilizados o metanol e a acetona como solventes para a extração dos compostos bioativos da polpa de físalis e pitaia.

Tabela 2 Compostos bioativos na polpa de físalis e pitaia.

Polpas	Compostos fenólicos totais (mg GAE/100 g)	Atividade antioxidante (DPPH) (µmol Trolox/g)	Atividade antioxidante (ABTS· +) (µmol Trolox /g)	Sistema betacaroteno/ac. linoleico (% de inibição)
Físalis	155,71±1,19	87,92±0,61	377,07±0,69	29,18±0,06
Pitaia	98,76±1,20	68,59±0,38	180,69±0,05	74,15±0,09

Para compostos fenólicos, o fruto de físalis apresentou teores de 155,71 mg GAE/100 g, resultado similar ao encontrado por Severo et al. (2010) em

frutos de *P. peruviana* em diferentes estágios de maturação, cujo teor de compostos fenólicos totais variou de 169,19 a 210,41 mgAGE.100 g⁻¹. O resultado do presente estudo também foi similar ao encontrado em *P. peruviana*, por Yildiz et al. (2015), em amostras provenientes da província de Bursa, na Turquia (136,64-154,55 mgAGE.100 g⁻¹) e superior ao de frutas comercializadas no mercado brasileiro, como polpa de amora (118,90 mg.100 g⁻¹), polpa de goiaba (83 mg.100 g⁻¹), polpa de uva (117,1 mg.100 g⁻¹) e morango (132, 1 mg.100 g⁻¹), relatados por Kuskoski et al. (2006).

O valor de compostos fenólicos para a pitaia obtido na pesquisa atual foi de 98,76 mg GAE/100 g, resultado superior ao encontrado por Tenorea; Novellino; Basile (2012) que relataram 78,1 e 654,6 mg GAE/100g de conteúdo de compostos fenólicos da polpa e da casca da pitaia vermelha, respectivamente. Lim et al. (2007) e Wu et al. (2006) encontraram teores médios de fenólicos totais em pitaias da polpa branca (21 mg.100 g⁻¹) e vermelha (42 mg.100 g⁻¹) inferiores aos encontrados no presente estudo e Abreu et al. (2012) encontraram 124,55 mg EAG.100 g⁻¹ em polpa de pitaia vermelha.

Os compostos fenólicos têm participação no sabor e no odor, na coloração e na vida de prateleira, estando a concentração de fenólicos correlacionada com a capacidade antioxidante (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O valor de DPPH (μmol TEAC.g⁻¹) encontrado neste trabalho, para a polpa de físalis, foi de 87,92 μmol TEAC.g⁻¹, próximo ao encontrado por Rockenbach et al. (2008a) que constataram alta atividade antioxidante em *Physalis peruviana*, 92,6 μmol TEAC.g⁻¹. Já em um estudo recente no qual se avaliou o estágio de maturação da físalis, foram obtidos valores muito menores avaliados por DPPH, variando de 21,0 a 34,1 μmol TEAC.g⁻¹ (NARVAEZ-CUENCA; MATEUS-GOMEZ; RESTREPO-SANCHEZ, 2014). Botero (2008), avaliando também a capacidade antioxidante dos frutos, encontrou 192,51 μmol

TEAC.g⁻¹. Para a fruta de pitáia, este autor encontrou 68,59 μmol TEAC.g⁻¹, resultado inferior ao relatado por Tenorea; Novellino; Basile (2012), de 166,5 μmol TEAC.g⁻¹ na polpa e de 195,2 μmol TEAC.g⁻¹ na casca de pitáia vermelha, pela técnica do DPPH.

O valor de ABTS encontrado neste estudo foi de 377,07 (μmol Trolox/g) para físalis, que foi superior ao encontrado por Narvaez-Cuenca; Mateus-Gomez; Restrepo-Sanchez (2014) que, estudando frutos frescos de físalis, encontraram variação de 79,4 a 132,7 (μmol Trolox/g). Para a pitáia, o valor de ABTS foi de 180,59 (μmol Trolox/g). Wu et al. (2006) relataram valores de ABTS de 28,3 (μmol Trolox/g) na polpa e 175 (μmol Trolox/g) na casca de pitáia vermelha.

Os valores de antioxidantes mais elevados aqui relatados podem estar relacionados, em adição, às diferenças em termos de origem geográfica e no método de extração. Além de uma extração em metanol, acetona aquosa 70% (v/v) foi também utilizada.

Os dados sobre a atividade antioxidante total (AAT) das polpas de físalis e pitáia pelo sistema betacaroteno/ácido linoleico mostram que a polpa da pitáia analisada apresentou alta AAT, com 74,15% de inibição no método do sistema betacaroteno/ácido linoleico e valores mais baixos (29,18%) para polpa de físalis. Isto pode estar associado ao alto teor de betacianinas presente na pitáia de polpa vermelha. Vaillant et al. (2005) atribuíram a alta atividade antioxidante da pitáia vermelha ao seu alto conteúdo de compostos fenólicos e betacianinas. Abreu et al. (2012), em estudo com polpa de pitáia vermelha, obtiveram em torno de 80% de inibição pelo sistema betacaroteno/ácido linoleico.

A atividade antioxidante pode depender de vários fatores, como as condições e as etapas de oxidação, formação e estabilidade dos radicais, assim como a possível localização dos antioxidantes e estabilidade em distintas fases do processamento nos alimentos (ROCKENBACH et al., 2008b).

3.3 Fermentação alcoólica

O processo de fermentação dos mostos de físalis e pitaia inoculados com a levedura *S. cerevisiae* CCMA 0200 foi acompanhado pelas análises de sólidos solúveis (SS), açúcares redutores (glicose e frutose), pH, contagem de células viáveis e análises cromatográficas.

3.3.1 Características da fermentação alcoólica

Durante o processo fermentativo, a concentração celular foi mantida entre $6,47 \log \text{ células.mL}^{-1}$ a $7,47 \log \text{ células.mL}^{-1}$, nos dois fermentados alcoólicos estudados, mostrando sua boa adaptação ao meio de fermentação. Estes resultados podem ser comparados com os de Oliveira et al. (2011), em cujo trabalho, durante o processo fermentativo com o mosto de cagaíta, a população de leveduras foi mantida entre 10^6 e 10^8 cel.mL^{-1} , e com os de Hidalgo et al. (2013) que mantiveram, durante a fermentação alcoólica de morangos, culturas selvagens de *S. cerevisiae* com uma população entre $2,02 \times 10^7 \text{ células/mL}$ a $5,38 \times 10^7 \text{ células/mL}$.

A técnica de vapor fluente utilizada no presente trabalho mostrou-se eficiente no controle microbiano, pois, durante a contagem de células viáveis, não foi observada a presença de bactérias.

A levedura *S. cerevisiae* CCMA 0200 consumiu os açúcares de forma mais rápida no fermentado alcoólico de físalis e, no tempo de 120 horas, estabilizou-se em torno de 6 °Brix, encerrando a fermentação. No fermentado alcoólico de pitaia, a fermentação se encerrou com 192 horas, quando o °Brix se estabilizou em torno de 6. Percebe-se, assim, que a composição nutricional do mosto de físalis e pitaia foi adequada para o crescimento e a multiplicação da levedura *S. cerevisiae* CCMA 0200.

Na literatura são verificados trabalhos que descrevem diferentes tempos de fermentação alcoólica de sucos de frutas. No fermentado de cajá, foi relatada fermentação de 10 dias (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003). Duarte et al. (2010) descreveram tempo de 48 horas de fermentação, em estudo de microvinificação de framboesa, partindo de um mosto contendo 16 °Brix com cepa de *S. cerevisiae*. O mesmo tempo de fermentação foi relatado por Tessaro et al. (2010) em fermentações alcoólicas de suco de laranja. Já Alves et al. (2011) avaliaram três cepas de *S. cerevisiae* em mosto de lichia e demonstraram que os teores de sólidos solúveis ficaram em torno de 8,1 e 8,2, e o final da fermentação foi após 9 dias. Diferenças nos tempos de fermentação alcoólica podem estar relacionadas a diferentes aspectos do processo de produção. Em geral, a mesma cepa de levedura se comporta diferentemente em resposta a diferentes mostos, o que pode ser devido à diferença na composição química das frutas de físalis e pitaia, como fonte de carbono, nitrogênio e sais minerais. As condições nutricionais, o pH, a acidez e a temperatura são fatores que podem influenciar o processo fermentativo (LEBEAU; JOUENE; JUNTER, 1998).

Os valores do pH não apresentaram grandes variações, atingindo seu valor final de, aproximadamente, 3,5 para o fermentado alcoólico de físalis e de 4,5 para o de pitaia (Figura 6 e 7). Corazza, Rodrigues e Nozaki (2001), durante a condução da fermentação alcoólica, também não verificaram muita variação de pH (entre 3,60 e 3,33). Bortolini, SantAnna e Torres (2001), avaliando as fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi em diferentes composições de mosto, observaram que valores de pH iniciais variaram de 3,8 a 4,0, entre os tratamentos. Segundo estes autores, esta faixa de pH utilizada foi suficiente para permitir uma rápida fermentação alcoólica e inibir bactérias indesejáveis. Em fermentados de jabuticaba (polpa e casca) foram atingidos pHs finais de 3,3 e 7,8, respectivamente (ASQUIERI et al., 2004). Lopes e Silva (2006) obtiveram, para o fermentado de figo-da-índia, pH final de 3,5.

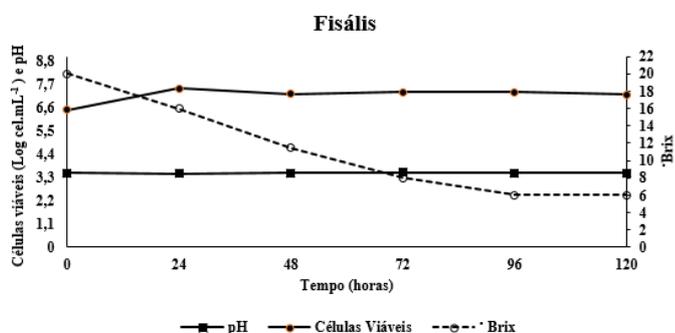


Figura 6 Consumo de sólidos solúveis, pH e concentração de células viáveis durante o processo fermentativo para a obtenção de bebida alcoólica fermentada de físalis

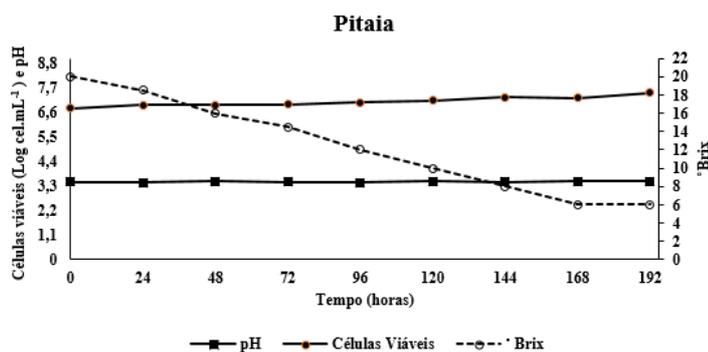


Figura 7 Consumo de sólidos solúveis, pH e concentração de células viáveis durante o processo fermentativo para a obtenção de bebida alcoólica fermentada de pitaia.

3.3.2 Análises cromatográficas

Durante a fermentação alcoólica do mosto de físalis e pitaia, foi mensurada a quantidade de frutose, glicose, etanol e glicerol presente, por análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Houve uma rápida conversão da sacarose em seus monossacarídeos fermentescíveis, glicose e frutose. É interessante notar que os valores de glicose ao final da fermentação encontravam-se próximos de zero para os dois fermentados, indicando total

consumo do substrato, o que também contribui para uma boa sanidade do vinho (Pato, 1982). Entretanto, essa observação não é válida para os teores de frutose nos processos fermentativos analisados. Observa-se que a glicose é consumida, preferencialmente, em detrimento da frutose. A concentração final de frutose do processo fermentativo foi de $0,71 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,48 \text{ g.L}^{-1}$, para fermentados de físalis e pitaia, respectivamente.

Nas Figuras 8 e 9 estão representados, também, os valores de etanol e glicerol obtidos durante o processo fermentativo do mosto de físalis e pitaia, utilizando a levedura *S. cerevisiae* CCMA 0200.

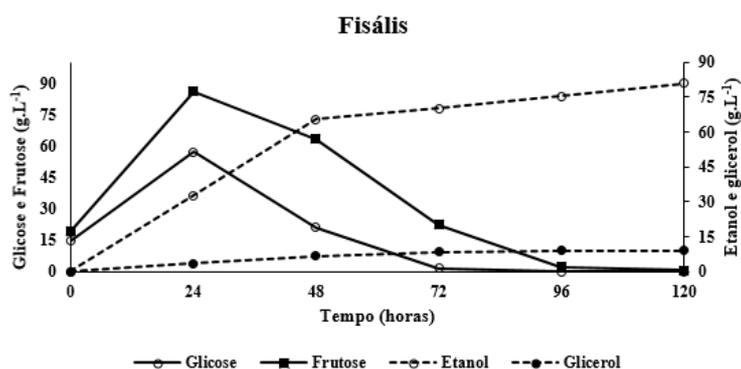


Figura 8 Concentrações de glicose, frutose, etanol e glicerol, obtidas durante o processo fermentativo para a obtenção de bebida alcoólica fermentada de físalis

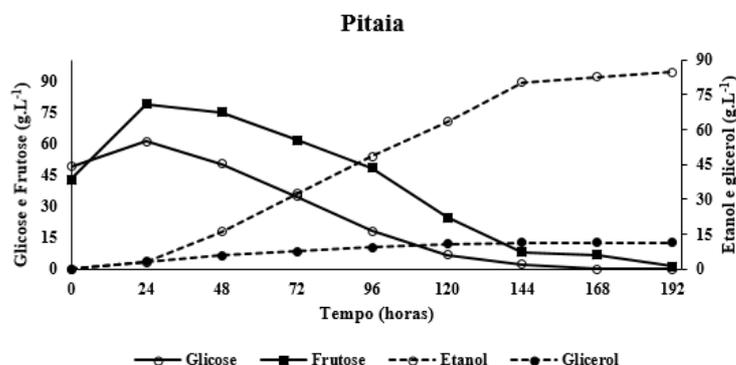


Figura 9 Concentrações de glicose, frutose, etanol e glicerol, obtidas durante o processo fermentativo para a obtenção de bebida alcoólica fermentada de pitaia

As concentrações de etanol encontradas no último dia de fermentação foram de 80,95 g.L⁻¹ (10,2 °GL), para o mosto de físalis e de 84,71,2 g.L⁻¹ (10,6 °GL), no mosto de pitaia. Esses valores estão de acordo com a legislação brasileira, que determina que a graduação alcoólica da bebida fermentada de fruta deve ser entre 4% a 14% em volume, a 20 °C (BRASIL, 2012). Os teores alcoólicos dos fermentados de físalis e pitaia foram similares aos de fermentados de frutas, como os de laranja, que apresentaram teor alcoólico em torno de 10 °GL (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001; GURAK; BORTOLINI, 2010), o de ciriguela com 10 °GL (MUNIZ et al., 2002), o de caju com 11,5 °GL (TORRES NETO et al., 2006), o de jabuticaba com 12 °GL (CHIARELLI; NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005) e o de cajá com 12,0°GL (DIAS et al., 2003). Isso mostra que as frutas de físalis e pitaia são bastante apropriadas para a fabricação de bebidas fermentadas.

As concentrações, tanto do etanol quanto do glicerol, podem contribuir para o “corpo” do vinho, além da doçura, da acidez, do sabor e da viscosidade (GAWEL; SLUYTER; WATERS, 2007). A concentração de glicerol final no mosto de físalis foi de 9,22 g.L⁻¹ e de 11,61 g.L⁻¹ no mosto de pitaia (Figuras 8 e

9). A concentração de glicerol geralmente formada por *S.cerevisiae* em vinhos varia de 1 a 15 g.L⁻¹ (REMIZE; SABLAYROLLES; DEQUIN, 2000).

De acordo com alguns autores, o glicerol é, quantitativamente, o mais importante subproduto da fermentação alcoólica, depois do etanol e do dióxido de carbono. Este composto não contribui diretamente para o aroma, devido à sua natureza não volátil, mas contribui significativamente para a qualidade do vinho, proporcionando suavidade e plenitude (REMIZE; SABLAYROLLES; DEQUIN, 2000; YALCIN; OZBAS, 2008).

Na Tabela 3 são apresentadas as concentrações de ácidos succínico, acético, málico, cítrico e láctico das bebidas fermentadas de físalis e pitaia. Os ácidos tartárico, oxálico, butírico e propiônico não foram detectados durante o processo fermentativo.

Tabela 3 Concentração de ácidos orgânicos presentes nas bebidas fermentadas de físalis e pitaia, detectados por CLAE

Ácidos orgânicos	Físalis	Pitaia
Succínico	6,76±0,04	1,82±0,02
Acético	0,98±0,02	1,77±0,08
Málico	0,34±0,00	2,00±0,02
Cítrico	12±0,28	2,37±0,84
Láctico	ND	2,34±0,18

ND – Não detectado

Em vinhos de uva, os ácidos podem ser provenientes da fruta (tartárico, málico e cítrico) ou da fermentação (succínico, láctico, acético, butírico, fórmico e propiônico) e estão presentes em quantidades que variam de 5 a 7 g.L⁻¹, equivalente a 1% a 8% em volume (JEFFERY; WILKINSON, 2014). Alguns autores relatam que, ao longo do processo de fermentação, os ácidos orgânicos produzidos são compostos de grande importância, pois têm influência sobre

diversas propriedades organolépticas, como aroma, sabor e cor, e também estão relacionados ao controle da estabilidade microbiológica das bebidas (MATO; LUQUE; HUIDOBRO, 2005). Crivellaro e Barnabé (2005) mencionaram que os ácidos orgânicos, além de influenciarem as características gustativas dos vinhos, são responsáveis, indiretamente, pela proteção aos compostos do vinho contra a degradação oxidativa.

A concentração de ácido succínico foi de 6,76 e 1,82 g.L⁻¹ para físalis e pitaia, respectivamente. Cherubin (2003) mencionou, em seus estudos, que o ácido succínico é considerado, quantitativamente, o principal ácido produzido pela levedura, e que sua formação é, provavelmente, resultado do desenvolvimento celular sob anaerobiose. Este autor cita, ainda, que não há nenhuma razão fisiológica para a sua formação. Ele exerce papel importante sobre o gosto e seu sabor é uma mistura de gosto ácido, salgado e amargo (WHITING, 1976). Resultados semelhantes já foram descritos, tendo sido relatada a concentração de 3,61 g.L⁻¹ de ácido succínico em fermentado de cagaita, 5,11 g.L⁻¹ em fermentado de jabuticaba e de 8,73 g L⁻¹ e 6,20 g L⁻¹ de ácido succínico em bebidas fermentadas elaboradas a partir de gabioba (DUARTE et al., 2010c; OLIVEIRA et al., 2011; Duarte et al., 2009).

O ácido acético também foi encontrado, tendo o fermentado de físalis a concentração de 0,98 g.L⁻¹ e o fermentado de pitaia, de 1,77 g.L⁻¹. Valores de ácido acético próximos dos encontrados para as bebidas fermentadas de físalis e pitaia foram encontrados por Dias et al. (2003, 2007) nos fermentados de cajá (0,9033 g L⁻¹) e cacau (1,1224 g L⁻¹), e por Duarte et al. (2009), nos fermentados de gabioba utilizando fermentação espontânea (1,64 g L⁻¹) e fermentação inoculada com a levedura UFLA CA1162 (1,21 g L⁻¹).

Com relação ao ácido málico, Peynaud (1982) relatou que é um dos ácidos mais distribuídos no reino vegetal, pois se encontra nas folhas e nos frutos. A presença de ácido málico, assim como de outros ácidos, é de grande

importância em vinhos e pode estar diretamente relacionada com a acidez (VOLSCHENK; VUUREN; VILJOEN-BLOOM, 2006). As concentrações detectadas desse ácido foram de $0,34 \text{ g.L}^{-1}$, no fermentado de físalis e de $2,81 \text{ g.L}^{-1}$ no de pitaia.

O ácido cítrico está comumente presente em vinhos e pode ser metabolizado por numerosos gêneros de bactérias lácticas, resultando na produção de ácido acético e diacetil, os quais têm importante efeito sobre o *flavor* do vinho (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2004). O fermentado de físalis apresentou teor de 12 g.L^{-1} de ácido cítrico e o de pitaia apresentou $2,37 \text{ g.L}^{-1}$. Diferentes concentrações de ácido cítrico foram encontradas em fermentados de frutas, como $0,5 \text{ g L}^{-1}$, no fermentado de cajá (DIAS et al., 2003); $5,5 \text{ g L}^{-1}$, no fermentado de cacau (Dias et al., 2007) e $3,13 \text{ g L}^{-1}$ e $4,05 \text{ g L}^{-1}$, no fermentado de gabioba, obtidos pela fermentação inoculada e espontânea, respectivamente (DUARTE et al., 2009).

A presença do ácido láctico foi detectada apenas no fermentado de pitaia na concentração de $2,34 \text{ g.L}^{-1}$.

3.3.3 Parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica

Na Tabela 4 apresentam-se os valores dos parâmetros cinéticos obtidos dos fermentados alcoólicos de físalis e pitaia. Em relação ao rendimento em etanol (Y_p/s), os fermentados de físalis e pitaia apresentaram valores próximos, $0,50 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,49 \text{ g.g}^{-1}$, respectivamente. Já o rendimento em glicerol (Y_g/s) foi de $0,05 \text{ g.g}^{-1}$, para o fermentado de físalis e de $0,07 \text{ g.g}^{-1}$, para o de pitaia. A produtividade em etanol (Q_p) foi maior no fermentado de físalis, $0,67 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e, em relação à eficiência fermentativa (E_f), o fermentado de físalis apresentou 98,95% e o de pitaia, 95,97%.

Tabela 4 Parâmetros cinéticos dos fermentados alcoólicos de físalis e pitaia

Fermentado de frutas	Variáveis			
	Yp/s (g/g)	Yg/s (g/g)	Qp (g.L-1.h ⁻¹)	Ef (%)
Físalis	0,50±0,028	0,06±0,000	0,67±0,007	98,95±0,176
Pitaia	0,49±0,014	0,07±0,000	0,39±0,021	95,97±0,523

Os valores de rendimento em etanol do presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por Duarte et al. (2010b), quando estudaram a fermentação alcoólica de framboesa e obtiveram valores em torno de 0,38 g.g⁻¹ a 0,49 g.g⁻¹.

Almeida et al. (2006) obtiveram, em fermentação alcoólica do fruto de mandacaru conduzida em fermentador de bancada, produtividade em etanol (Qp = 1,75 g/Lh) acima da observada no presente estudo. No entanto, os autores descreveram valores semelhantes de rendimento (YP/S = 0,461 g/g) e eficiência (Ef = 90,2%).

Por outro lado, Silva et al. (2007) descrevem valores inferiores de rendimento (YP/S = 0,3g/g) e eficiência (Ef = 57,78%) em fermentação alcoólica de suco de caju.

Bortolini, Sant'anna e Torres (2001), ao avaliarem o rendimento, a eficiência e a produtividade em vinho de kiwi, encontraram 43,50% de rendimento, 83,14% de eficiência e 1,40 g/Lh de produtividade volumétrica.

Tessaro et al. (2010), ao elaborarem fermentado alcoólico de laranja, obtiveram rendimento de 70,48% a partir de mosto com 18 °Brix e 71,75% em mosto com 22 °Brix e produtividade de 0,25 e 0,28 g/Lh com 18° Brix e 22° Brix, respectivamente.

3.3.4 Compostos bioativos nos fermentados alcoólicos

Os resultados referentes ao teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante total dos fermentados alcoólicos de físalis e pitaia são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 Compostos bioativos presentes nos fermentados de físalis e pitaia

Fermentados alcoólicos	Compostos fenólicos totais (mg GAE/100g)	Atividade antioxidante (DPPH) ($\mu\text{mol Trolox/ml}$)	Atividade antioxidante (ABTS\cdot+) (mM)
Físalis	64,56 \pm 0,72	9,07 \pm 0,03	20,30 \pm 0,04
Pitaia	50,88 \pm 0,60	16,67 \pm 0,74	25,64 \pm 0,62

Em relação aos compostos fenólicos totais, foram encontrados conteúdos de 64,56 mg GAE/100 g, para o fermentado de físalis e 50,88 mg GAE /100 g, para o fermentado de pitaia. Verifica-se que houve redução na concentração de compostos fenólicos presentes no fermentado alcoólico em relação à fruta bruta.

A redução do conteúdo de fenólicos totais dos fermentados alcoólicos em relação à matéria-prima pode estar relacionada ao fato de o mosto ter sido formulado com a polpa da fruta, ou seja, sem cascas e sem sementes, e pelo fato de ele ter passado pelo processo de vapor fluente. De fato, maiores conteúdos de polifenóis são encontrados nas cascas e nas sementes das frutas.

Os resultados do presente estudo foram comparados com fermentados alcoólicos de outras frutas, pelo fato de existirem poucos trabalhos, na literatura científica, quantificando compostos bioativos de fermentado alcoólico de físalis e pitaia.

Su e Chien (2007) sugerem que a presença de cascas no mosto durante fermentação pode contribuir para maior conteúdo de compostos fenólicos totais no fermentado alcoólico.

Chang et al. (2015), ao avaliarem o conteúdo de compostos fenólicos totais em vinhos de arroz, encontraram valores entre 56,4 mg GAE/g a 198,9 mg GAE/g.

A pesquisa de atividade antioxidante por meio dos métodos de captura dos radicais DPPH e ABTS mostrou que os fermentados alcoólicos de físalis e pitaia apresentam atividade antioxidante. Possivelmente, a atividade antioxidante do produto está associada à presença de compostos polifenólicos, flavonoides e antocianinas, entre outros oriundos da matéria-prima.

O fermentado de físalis apresentou atividade antioxidante de 9,07 $\mu\text{mol TEAC/mL}$ e o fermentado de pitaia, de 16,67 $\mu\text{mol TEAC/mL}$, pelo método DPPH e de 20,30 mM, o fermentado de físalis e de 25,64 mM, o fermentado de pitaia, pelo método ABTS.

Budak e Guzel-Seydim (2010) verificaram valores inferiores em vinhos de uvas (*Ulugbey Karasi*) ao quantificarem antioxidantes pelo método ABTS. Tais autores descrevem valores de 11,20 mM. Da mesma forma, Mulero, Pardo e Zafrilla (2010), ao avaliarem a atividade antioxidante (método ABTS) de vinhos de uva tradicional e orgânica, encontraram atividade de 6,78 mM em vinho de uvas orgânicas e 6,02 mM no vinho de uvas tradicionais.

Já Garaguso e Nardini (2015) apresentaram valores próximos ao do presente estudo. Para os vinhos tintos orgânicos, obtiveram 23,7 mM ABTS e, para vinhos convencionais, 18,8 mM ABTS.

Com relação ao método DPPH, Ubeda et al. (2013), ao realizarem a avaliação da atividade antioxidante de vinhos de morango, descrevem valores de 1.758 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, 1.838 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, 1.870 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, obtidos em fermentações conduzidas de forma espontânea com leveduras selvagens nativas

(sem inoculação) e 1.421 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, 1.649 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, 1.699 $\mu\text{mol TEAC/kg}$, conduzidas em fermentações alcoólicas inoculadas. Brandão (2013) produziu fermentado alcoólico de yacon e avaliou seu potencial antioxidante pelo método DPPH. Este autor encontrou 1,605 $\mu\text{mol TEAC.mL}^{-1}$ no fermentado, valor inferior aos obtidos neste trabalho.

3.3.5 Análise sensorial

As bebidas elaboradas foram submetidas à análise sensorial, para verificar sua aceitação junto ao público. Os resultados da análise sensorial estão apresentados na Tabela 6, na qual se observam as notas atribuídas às bebidas, assinaladas na escala hedônica de 9 pontos. Para o atributo aroma, os fermentados alcoólicos de físalis e pitaia diferiram significativamente ($p < 0,05$), apresentando aceitação média de 8,06 para o fermentado de físalis e média de 7,04 para o de pitaia, o que representa que os provadores gostaram moderadamente do fermentado de pitaia e gostaram muito do fermentado de físalis. Essa nota, certamente, é devido às altas concentrações de compostos formadores de aroma, como álcoois superiores e ésteres. Para o atributo sabor, os valores médios foram de 6,62, para físalis e de 6,72, para pitaia.

Arruda et al. (2007) apresentaram média de 5,4 para o sabor no seu fermentado de banana, enquanto o vinho de Barnabé (2006) obteve notas entre 5,2 e 5,8, inferiores às médias encontradas para os fermentados de físalis e pitaia.

De acordo com Nurgel et al. (2002), compostos específicos presentes em vinhos são responsáveis pelas características típicas de aroma e sabor. A principal origem desses compostos é o metabolismo das leveduras durante a fermentação, entretanto, alguns compostos nos vinhos se originam das frutas utilizadas como substrato.

Para os atributos cor e viscosidade, os valores médios foram entre 7,36 a 7,66, para os fermentados de físalis e pitaia e, assim, os provadores relataram terem gostado moderadamente desses atributos. Nesse contexto, destaca-se que o processo de elaboração do fermentado alcoólico de físalis e pitaia dispensa o uso de clarificantes enzimáticos e, através de filtração, obtém-se fermentado límpido e de aspecto semelhante ao de vinho branco e tinto.

Já no parâmetro impressão global a média foi de 6,88, para o fermentado de físalis e de 6,90, para o fermentado de pitaia. Arruda et al. (2007) encontraram média de 6,39 para a aceitação global. Barnabé (2006) recebeu notas entre 5,5 e 6,1, para o mesmo atributo.

Tabela 6 Nota de aceitação para os atributos aroma, sabor, cor, viscosidade e impressão global (IG) do vinho elaborado a partir das frutas físalis e pitaia

Vinho	Aroma	Sabor	Cor	Viscosidade	IG
Físalis	8,06 ^a	6,62 ^a	7,36 ^a	7,66 ^a	6,88 ^a
Pitaia	7,04 ^b	6,72 ^a	7,58 ^a	7,55 ^a	6,90 ^a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Em suma, os provadores indicaram notas maiores que 6 na escala hedônica para todos os atributos avaliados. A avaliação geral dos fermentados de físalis e pitaia foi superior à de outros fermentados alcoólicos de frutas. No estudo de Dias, Schwan e Lima (2003), 51,1% dos provadores relataram ter gostado muito ou extremamente do fermentado alcoólico de cajá. Já no estudo de Duarte (2008), a aceitação foi de 47,83% para fermentado de gabioba inoculado com a mesma levedura utilizada no presente trabalho (CCMA 0200). No trabalho de Maeda e Andrade (2003), a aceitação variou entre 62,96% e

85,18%, para diferentes fermentados à base de camu-camu, considerando como aceitação notas superiores a 6 na escala hedônica.

Foi realizado também o teste CATA, de acordo com o qual os consumidores caracterizaram ambos os vinhos com sabor alcóolico e frutado. O sabor ácido também caracterizou o vinho de físalis.

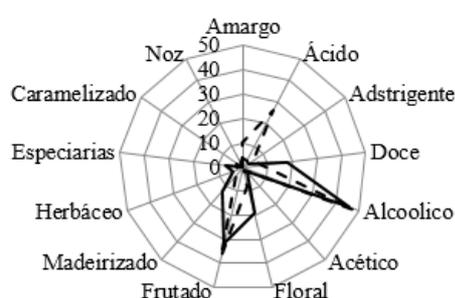


Figura 10 Caracterização sensorial dos vinhos produzidos a partir das frutas físalis (linha pontilhada) e pitaia (linha contínua). O centro do diagrama corresponde à menor intensidade de percepção dos atributos, enquanto a extremidade corresponde à maior intensidade de percepção dos atributos

3.4 Fermentação acética

A produção de vinagre foi realizada utilizando-se cultura mista de células de *A. aceti* (CCT 0190), *G. oxydans* (CCMA 0350) e *A. pasteurianus* (CCMA 0239) e uma fermentação submersa realizada em biorreator.

O etanol produzido na fermentação alcoólica foi consumido gradativamente durante a fermentação acética pelas bactérias utilizadas como inóculo e, então, o ácido acético foi produzido. A acetificação foi concluída quando o consumo de etanol e a produção de ácido acético foram estabilizados, o que foi observado após 192 horas, para o fermentado de físalis e 120 horas para o fermentado de pitaia.

A cultura mista de bactérias do ácido acético utilizada neste trabalho mostrou-se eficiente para produzir vinagre de vinho de físalis e pitaia. A população bacteriana manteve a concentração estável durante toda a fermentação e, ao final da acetificação, ela foi de $8,04 \log \text{CFU.mL}^{-1}$, para o vinagre de físalis e de $8,11 \log \text{CFU.mL}^{-1}$, para o vinagre de pitaia (Figuras 11 e 12).

Dados sobre a produção de ácido acético e o consumo de etanol durante a fabricação dos vinagres podem ser observados nas Figuras 11 e 12.

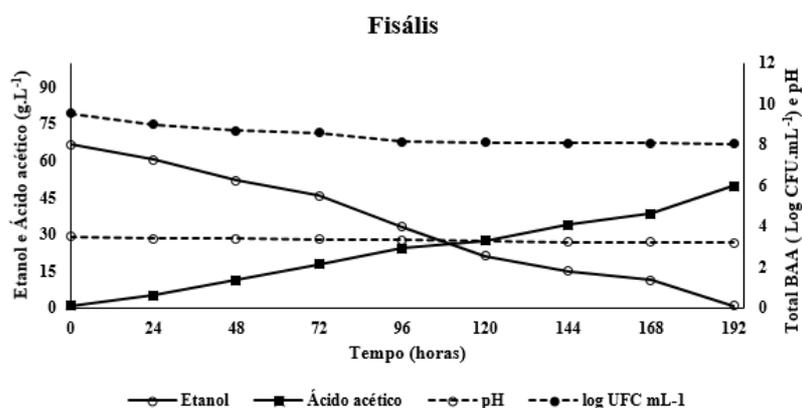


Figura 11 Concentração de etanol, ácido acético, pH e células viáveis, durante a fermentação acética de físalis conduzida

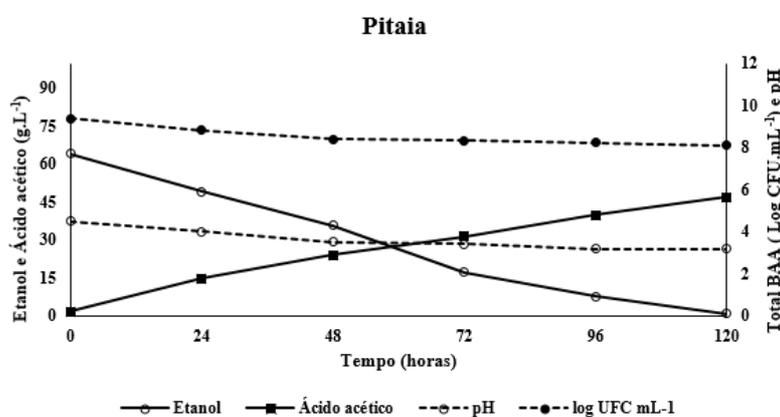


Figura 12 Concentração de etanol, ácido acético, pH e células viáveis, durante a fermentação acética de pitaia conduzida

No primeiro dia da fermentação acética, o etanol foi mensurado em 66,65 g/L, chegando a 0,97 g/L, no último dia da fermentação, para o vinagre de físalis. No vinagre de pitaia, o etanol foi mensurado em 64,19 g/L, chegando a 0,89 g/L no último dia da fermentação. Esse etanol é oxidado a ácido acético por BAA.

A legislação brasileira preconiza que vinagres de frutas não devem exceder 1% (v/v) em álcool. De acordo com os dados apresentados nas Figuras 11 e 12, os valores obtidos nas duas fermentações acéticas estão em consonância com a legislação vigente. Bortolini, Sant'anna e Torres (2001) elaboraram vinagre de kiwi, obtendo um vinagre com 1% de etanol.

Rizzon e Meneguzo (2006) relataram que a presença de residual alcoólico é importante para que os microorganismos presentes não degradem o ácido acético produzido.

A formação de ácido acético foi crescente ao longo de cada processo de acetificação. No início da fermentação acética de físalis havia 0,98 g/L de ácido acético e, ao final da fermentação, foram mensurados 49,85 g/L. Já na fermentação de pitaia havia 1,77 g/L de ácido acético e, ao final da fermentação,

47,14 g/L. Os valores de ácido acético observados nos vinagres obtidos das duas frutas (Figuras 11 e 12) demonstram que a acidez em ácido acético dos vinagres obtidos está coerente com a legislação brasileira.

Brasil (2013) preconiza que vinagres obtidos de frutas devem conter acidez titulável de, no mínimo, 4,00 g/100 mL. Tal parâmetro foi fixado no presente trabalho como valor mínimo para determinar a finalização em cada uma das acetificações realizadas.

Hidalgo et al. (2013), ao elaborarem vinagre de vinho tinto, estabeleceram, como critério de finalização da oxidação acética, o conteúdo de 6 g/100 mL de ácido acético. Budak e Guzel-Seydim (2010) descreveram valores superiores em vinagre elaborado a partir de vinho de uvas *Ulugbey Karasi* (8,515 g/100 mL). Vinagres comerciais de vinho de arroz foram avaliados por Zhang et al. (2006), que relataram valores de 4 g/100 mL e 4,4 g/100 mL. Saha e Banerjee (2013) obtiveram vinagre de banana com 4,67 g/100 mL de ácido acético.

Silva et al. (2007) descreveram, em fermentados acéticos de caju, valores de 4,0 g/100 mL de ácido acético a partir de vinhos contendo etanol entre 4,8% e 6,0%. Já Masino et al. (2008) relataram valores inferiores em vinagres balsâmicos *Orange label* (2,65 g/100 mL). Marques et al. (2011) relataram valores semelhantes de acidez em vinagre de maçã (4,17 g/100 mL), assim como valores superiores em vinagre de vinho tinto (5,0 g/100 mL).

Pode-se constatar que houve pouca variação de pH ao longo dos sucessivos ciclos de acetificação. O pH final do vinagre de físalis foi de 3,19 e do vinagre de pitáia foi de 3,2, valores atribuídos à produção elevada de ácido no processo de fermentação (figuras 11 e 12).

A variação do pH entre diferentes vinagres está ligada à matéria-prima utilizada. Na literatura científica foram realizados estudos referentes à verificação do pH em fermentações acéticas. Marques et al. (2011) descreveram

valores inferiores analisados em vinagres comerciais provenientes de frutas, tais como vinagre de manga (2,65), vinagre de vinho tinto (2,69), vinagre de arroz (2,89) e valores levemente semelhantes em vinagres de vegetais, como milho (3,05). Em fermentação acética a partir de vinho de laranja com 18 °Brix, Tessaro et al. (2010) observaram valores superiores de pH (3,56).

3.4.1 Análises cromatográficas da fermentação acética

Durante a fermentação acética de físalis e pitaia, foi mensurada a quantidade de ácidos presentes por análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na Tabela 7 são apresentadas as concentrações de ácidos succínico, málico e cítrico do vinagre de físalis e pitaia. Os ácidos tartárico, oxálico, butírico, láctico e propiônico não foram detectados durante o processo fermentativo. O conteúdo dos ácidos málico e succínico aumentou em relação aos valores obtidos na fermentação alcoólica relatada anteriormente. Estes ácidos (cítrico, málico e succínico) também foram encontrados por Jang et al. (2015) em vinagres comerciais e tradicionais da Coreia.

Tabela 7 Concentração de ácidos orgânicos presentes nos vinagres de físalis e pitaia, detectados por CLAE

Ácidos orgânicos	Físalis	Pitaia
Succínico	7,31±0,05	2,95±0,04
Málico	0,36±0,00	2,81±0,03
Cítrico	12,94±0,22	1,55±0,43

3.4.2 Rendimento da fermentação acética

Os principais parâmetros cinéticos obtidos nas fermentações acéticas de polpa de físalis e pitaia são mostrados na Tabela 8.

Os rendimentos GK obtidos para os fermentados acéticos de polpa de físalis e pitaia foram de 75% e 72%, respectivamente. Suman (2012) encontrou rendimentos GK variando de 31,54% a 66,08%, em processos de fermentação acética de gengibre e fécula pelo método lento, durante 27 dias. Bortolini, Sant'anna e Torres (2001), utilizando kiwi na produção de vinagre pelos processos submersos e gerador, obtiveram rendimentos de GK altos para todos os tratamentos (98,07% a 100,21%).

Tabela 8 Parâmetros cinéticos da fermentação acética de físalis e pitaia

Parâmetros cinéticos	Fermentado acético de físalis	Fermentado acético de pitaia
Rendimento GK (%)	75±0,07	72±0,60
Rendimento Yácido (%)	73±0,42	71±0,73
Produtividade em ácido acético (g L⁻¹ h⁻¹)	0,30±0,01	0,46±0,00

Os rendimentos GK dos processos de acetificação foram próximos aos valores encontrados para fermentados acéticos de manga obtidos por Barbosa (2014), que apresentam valores de GK de 70,41%, 59,20% e 62,00%.

Os rendimentos em ácido Yácido dos fermentados acéticos de polpa de físalis e pitaia foram de 73% e 71%, respectivamente. Esses valores são superiores aos relatados por Zilioli (2011) para fermentados acéticos de cana (61%), carambola (64%) e toranja (54%) e próximos aos rendimentos encontrados para fermentados acéticos de milho (71%) (ZILIOLI, 2011) e aos de manga, obtidos por Barbosa (2014) que encontrou rendimentos próximos a 80%.

A produtividade média máxima de ácido acético obtida em biorreator clássico foi de 0,066 g L⁻¹ h⁻¹ para a fermentação acética de maçã (PEDROSO, 2003), valor abaixo do encontrado para a fermentação acética de físalis e pitaia.

3.4.3 Compostos bioativos nos fermentados acéticos

Os resultados referentes ao teor de fenólicos totais e à capacidade antioxidante total dos fermentados acéticos de físalis e pitaia são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 Compostos bioativos presentes nos vinagres de físalis e pitaia

Fermentados acéticos	Compostos fenólicos totais (mg GAE/g)	Atividade antioxidante (DPPH) (µmol Trolox/mL)	Atividade antioxidante (ABTS· +) (mM)
Físalis	56,38±0,72	8,44±0,11	17,63±0,56
Pitaia	36,56±0,73	10,33±0,35	23,38±0,84

Quanto aos compostos bioativos presentes em vinagres são ressaltados, em especial, os compostos fenólicos totais, os quais estão diretamente associados à matéria-prima utilizada, bem como às quantidades de frutas empregadas no início da fermentação alcoólica. De acordo com os dados da Tabela 9, verificou-se conteúdo de 56,3 mg GAE/g no vinagre de físalis e de 36,56 mg GAE/g no vinagre de pitaia. Valores superiores foram relatados em estudos realizados por Wang, Zhang e Li (2012), que demonstraram valores de 269,7 mg GAE/g em vinagres tipo Shanxi (fermentado acético da China cozido à temperatura de 85 °C, por seis dias e envelhecido, o qual é obtido a partir de vinho contendo como matérias-primas trigo tipo mourisco, aveia, farelo de trigo e ervilha, e, posteriormente, durante fermentação acética).

Su e Silva (2005) estudaram a atividade antioxidante de mirtilo e seus produtos obtidos por fermentação e concluíram que o processo de vinificação reduziu significativamente o conteúdo de antocianinas totais e o teor de polifenóis totais de subprodutos, mas não afetou significativamente a atividade antioxidante. Estes autores observaram também que a acetificação diminuiu significativamente teores de antocianinas totais, polifenóis totais e atividade antioxidante. Ainda neste mesmo estudo, ficou claro que estes produtos ainda mantiveram importantes concentrações de fenólicos e atividades antioxidantes.

Diversos estudos verificando atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS são encontrados, em diferentes tipos de frutas. No entanto, há poucos relatos descrevendo atividade antioxidante em vinagres de frutas. Outro ponto a ser ressaltado é a dificuldade de comparar resultados em função da diversidade de unidades em que a atividade antioxidante é expressa.

Com relação ao método DPPH, foram verificados valores de 8,44 $\mu\text{mol TEAC/mL}$, no vinagre de físalis e de 10,33 $\mu\text{mol TEAC/mL}$, no vinagre de pitaia. Tais valores são próximos aos descritos por Cerezo et al. (2010) que, ao avaliarem a atividade antioxidante, obtiveram 10,3 mmol TEAC/g em vinagres de Cabernet Sauvignon. Budak, Guzel-Seydim (2010) obtiveram, em vinagre de uva, 13,50 $\mu\text{mol TEAC/mL}$. Já Ubeda et al. (2013) descreveram valores entre 3.227 $\mu\text{mol TEAC/kg}$ a 3.388 $\mu\text{mol TEAC/kg}$ em vinagre de morango.

Já na atividade antioxidante frente ao radical livre ABTS foram verificadas atividades de 17,63 mM no vinagre de físalis e de 23,38 mM no vinagre de pitaia. Valores superiores foram relatados por Echavarría et al. (2012) em fermentados acéticos de bambu, os quais variaram de 500 mM a 950 mM. Por outro lado, Ubeda et al. (2013), ao avaliarem vinagres de morango obtidos por meio de fermentação espontânea, relataram 11,06 $\mu\text{mol Trolox/kg}$ e oriundos de fermentação inoculada, 10,13 $\mu\text{mol Trolox/kg}$. Resultados inferiores foram descritos, por Alonso et al. (2004), em vinagres de jerez (4 mM a 6 mM).

3.4.4 Atividade antimicrobiana dos fermentados acéticos

A eficácia de sanitizantes, como os ácidos orgânicos, tem sido estudada, a fim de aumentar a segurança microbiológica dos alimentos (SENGÜN E KARAPINAR, 2004). Os ácidos orgânicos são ácidos fracos que, geralmente, são considerados eficazes contra agentes patogênicos de origem alimentar, além de ácidos inorgânicos, tais como ácido clorídrico (BUCHANAN et al., 2004). Os ácidos orgânicos, incluindo ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico e ácido cítrico, são naturalmente encontrados em uma variedade de frutas e alimentos fermentados (FANG; HSUEH, 2000).

Geralmente, as espécies de antimicrobianos, como os ácidos orgânicos, são espécies inteiramente protonadas que podem se difundir para a célula bacteriana e causar morte celular (BJORNSDOTTIR; BREIDIT JR.; MCFEETERS, 2006; BRUL; CROOTE, 1999). Mecanismos de atividade antimicrobiana são baseados na inibição de enzimas, na função da membrana, no transporte de nutrientes e na atividade metabólica global (BLACKBURN; MCCLURE, 2002).

Produtos acidificados poderão limitar o crescimento microbiano ou a sua sobrevivência, dependendo dos tipos de microrganismos e da quantidade de ácido, em especial a sua capacidade de tamponamento (BJORNSDOTTIR; BREIDIT JR.; MCFEETERS, 2006). Assim, o vinagre (ácido acético) foi estudado por alguns autores devido à sua eficácia na remoção de patógenos de frutas e legumes frescos (RHEE et al, 2003; WU et al., 2000).

Os métodos utilizados no presente estudo para avaliação antimicrobiana dos vinagres foram o de concentração mínima inibitória (CMI) e o de concentração mínima bactericida (CMB). No MIC foram utilizadas diferentes concentrações de vinagre. Os resultados apresentados nas Tabelas 10 e 11 mostram que as três soluções de vinagres a 6,25% inibiram o crescimento de

Escherichia coli, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*. Vale lembrar que os vinagres de físalis e pitaia a 6,25% contêm 0,30% de ácido acético em sua composição. Os experimentos foram realizados em triplicata de três repetições. Foram encontrados os mesmos resultados no teste triplicata.

Tabela 10 Concentração mínima inibitória (CMI) dos vinagres testados (% v/v) para bactérias gram-negativas

Diluição	<i>E. coli</i> +vinagre físalis	<i>E. coli</i> vinagre pitaia	<i>E. coli</i> vinagre comercial	<i>S.enterit</i> +vinagre físalis	<i>S.enterit</i> +vinagre pitaia	<i>S.enterit</i> +vinagre Comercial	Controle negativo
100%	-	-	-	-	-	-	-
50%	-	-	-	-	-	-	-
25%	-	-	-	-	-	-	-
12,5%	-	-	-	-	-	-	-
6,25%	-	-	-	-	-	-	-
3,12%	+	+	+	+	+	+	-
1,56%	+	+	+	+	+	+	-
0,78%	+	+	+	+	+	+	-

Tabela 11 Concentração mínima inibitória (CMI) dos vinagres testados (% v/v) para bactérias gram-positivas

Diluição	<i>S.aureus</i> +vinagre físalis	<i>S.aureus</i> +vinagre pitaia	<i>S.aureus</i> +vinagre comercial	<i>L.mono</i> +vinagre físalis	<i>L.mono</i> +vinagre físalis	<i>L.mono</i> +vinagre Pitaia	Controle negativo
100 %	-	-	-	-	-	-	-
50 %	-	-	-	-	-	-	-
25 %	-	-	-	-	-	-	-
12,5 %	-	-	-	-	-	-	-
6,25 %	-	-	-	-	-	-	-
3,12 %	+	+	+	+	+	+	-
1,56%	+	+	+	+	+	+	-
0,78%	+	+	+	+	+	+	-

Os resultados do ensaio de concentração mínima bactericida (CMB) para tubos sem crescimento, para *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* com vinagres de físalis e pitaia, são mostrados abaixo na tabela 12 e 13. Não houve crescimento em TSA

Tabela 12 Resultados do teste de CMB para poços sem crescimento em TSA para bactérias gram-negativas

Diluição	E. Coli +vinagre físalis	E. Coli vinagre pitaia	E. Coli vinagre comercial	<i>S.enterit</i> +vinagre físalis	<i>S.enterit</i> +vinagre pitaia	<i>S.enterit</i> +vinagre comercial
25%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12,5%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6,25%	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND - não detectado

Tabela 13 Resultados do teste de CMB para poços sem crescimento e em TSA para bactérias gram-positivas

Diluição	<i>S.aureus</i> +vinagre físalis	<i>S.aureus</i> +vinagre pitaia	<i>S.aureus</i> +vinagre comercial	<i>L.mono</i> +vinagre físalis	<i>L.mono</i> +vinagre físalis	<i>L.mono</i> +vinagre pitaia
25%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12,5%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6,25%	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND - não detectado

O método CMI realizado nos microrganismos é um instrumento que determina uma concentração específica de vinagre que pode interferir de maneira negativa no metabolismo bacteriano, interrompendo ou, até mesmo, inibindo o seu crescimento e multiplicação, e assim manter o efeito antimicrobiano. Já o método CMB é a concentração específica de vinagre que pode matar de forma direta as bactérias utilizadas no estudo.

Molineros et al. (1991) verificaram que o ácido acético a 2,5%, 5,0% e 99,5% apresentou atividade antimicrobiana satisfatória sobre cepas de *E. coli*.

Tais resultados contrapõem-se aos achados neste trabalho, considerando que, neste estudo, os vinagres com 0,30% de ácido acético inibiram cepas de *E. coli*.

Benassatti et al. (1994) constataram que concentração igual ou inferior a 0,7%, especificamente a 0,5%, de ácido acético pode atuar como agente desinfetante frente às cepas de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* presente nos materiais semicríticos.

Segundo alguns estudos, consideráveis quantidades de vinagres contendo ácido acético estão sendo conhecidas por ter forte ação antimicrobiana contra a atividade de bactérias (KARAPINAR; GONÜL, 1992; MEDINA et al., 2007).

Akiyama et al. (1999) realizaram um estudo *in vitro* com cepas de *Staphylococcus aureus* utilizando duas substâncias, ácido acético e ácido clorídrico, sob mesmas condições de pH e verificaram que o ácido acético foi mais efetivo, supondo que essa ação, até certo ponto, deve ser do próprio produto e não ao baixo pH.

Foi testada a eficácia de vinagre de arroz com várias soluções diluídas na redução da contagem de inoculado de *E. coli* O157: H7 em alface. Os resultados obtidos indicaram que o tratamento com 5% de ácido acético (pH 3,0), durante 5 minutos, a 25 °C, poderia reduzir 3 log UFC g⁻¹ de *E. coli* O157: H7 em alface picado, inicialmente inoculado com 7 UFC g⁻¹ (CHANG; FANG, 2007). Assim, conclui-se que o tratamento de alface inoculada com vinagre de arroz pode oferecer um método útil para diminuir o risco de *E. coli* O157: H7, quer em restaurantes ou em casa.

Jirawan e Warawut (2009) constataram que o crescimento da *Salmonella enteritidis* foi controlado pelo uso de vinagre fermentado vaporizado, resultado condizente com os resultados desta pesquisa.

Um estudo realizando o método de concentração mínima inibitória foi realizado utilizando-se diferentes concentrações de vinagre. Os resultados mostraram que 1/160 foi a concentração mínima de vinagre que inibiu o

crescimento de *E. coli*. Foi realizado também, nesse estudo, o método de concentração mínima bactericida (CMB) que foi aplicado para os tubos que não tiveram crescimento. Os resultados do teste de CMB não mostraram qualquer tipo de crescimento e indicaram que o vinagre que contém ácido acético tem forte efeito bactericida (SHAH; BIBI; SHAH, 2013).

3.4.5 Análise sensorial

Na análise sensorial dos vinagres produzidos, aparência, sabor, aroma e impressão global não apresentaram diferença estatística entre as formulações de físalis e pitaia. No entanto, o aroma, teoricamente, deveria ter apresentado diferença, devido ao odor característico de cada fruta, o que não foi observado.

Estes resultados se assemelham aos encontrados por Bortolini; Sant'anna e Torres (2001), ao avaliarem estes mesmos parâmetros sensoriais em diversas formulações de vinagres produzidos com kiwi.

Pestana et al. (2004), avaliando sensorialmente vinagres produzidos de flores de *Malvaviscus arboreus* Cav. e de *Hibiscus rosa-sinensis* L., não encontraram diferença estatística em relação à cor, semelhante ao encontrado neste estudo.

Granada et al. (2000), avaliando sensorialmente o odor de diversas formulações de vinagres produzidos a partir de folhas de vidreiras, também não encontraram diferença em relação ao odor, semelhante ao encontrado nesta pesquisa.

Observa-se que os vinagres produzidos apresentaram notas superiores a 7, demonstrando a boa aceitação por parte dos provadores. O mesmo foi encontrado por Ilha et al. (2000) na avaliação de vinagre produzido a partir de mel.

Tabela 14 Nota de aceitação para os atributos aparência, sabor, aroma e impressão global (IG) do vinagre elaborado a partir do vinho de físalis e pitaia

Vinagre	Aparência	Sabor	Aroma	IG
Físalis	8,08 ^a	7,32 ^a	7,36 ^a	7,40 ^a
Pitaia	8,04 ^a	7,40 ^a	7,42 ^a	7,42 ^a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

De acordo com o teste CATA, os consumidores caracterizaram ambos os vinagres com sabor azedo, aroma de ácido acético e frutado, e aspecto límpido. O aroma cítrico também caracterizou o vinagre de físalis.



Figura 13 Caracterização sensorial dos vinagres produzidos a partir de físalis (linha pontilhada) e pitaia (linha contínua). O centro do diagrama corresponde à menor intensidade de percepção dos atributos, enquanto a extremidade corresponde à maior intensidade de percepção dos atributos

Não foram observadas grandes diferenças entre os dois vinagres produzidos no presente trabalho. Os dois vinagres produzidos foram bem aceitos pelos avaliadores.

4 CONCLUSÕES

As bebidas alcoólicas fermentadas obtidas apresentaram teor alcoólico dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

Os vinagres obtidos apresentaram teor alcoólico e de ácido acético dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira

Os fermentados alcoólicos e acéticos de físalis e pitaia apresentaram conteúdos de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

Os fermentados acéticos apresentaram atividade antimicrobiana.

Os fermentados alcoólicos e os vinagres produzidos tiveram aceitação satisfatória pela análise sensorial realizada.

REFERÊNCIAS

- ABREU, W. C. et al. Características físico-químicas e atividade antioxidante total de pitaias vermelha e branca. **Ver. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.71, n. 4, p. 656-61, 2012.
- ADAMS, M. R. Vinegar. In: WOOD, B. J. B. **Microbiology of fermented foods**. London: Elsevier Applied Science, v. 1, p. 1-44, 1998.
- AKIYAMA, H. et al. Effects of acetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus*. **Acta Dermatol. Res.**, Okayama, v. 291, p. 570-573, 1999.
- ALMEIDA, M. et al. Cinética da Produção do Fermentado do Fruto do Mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p.35-42, jun. 2006.
- ALONSO, Á. M. et al. Study of the antioxidante power of brandies and vinegars derived from Sherry and correlation with their contents in polyphenols. **Food Research International**, Barking, v.37, n. 7, p. 715-721. Mar. 2004.
- ALVES, J. A. et al. Chemical, Physical-Chemical, and Sensory Characteristics of Lychee (*Litchi chinensis*?Sonn) Wines. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, p. S330-S336, 2011.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 17. Ed. Washington DC, 2000.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 15.ed. Washington DC, 1990.
- AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Blucher, 2001. v.4.
- ARES, G. et al. Application of a check-all-that-apply questions to the development of chocolate milk desserts. **Journal of Sensory Studies**, Dijon, v. 25, p. 67-86, 2010.
- ARRUDA, A. R. et al. Caracterização físico-química e avaliação sensorial de bebida fermentada alcoólica de banana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.38, n.4, p.377-384, Out.- Dez., 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 17. ed. Arlington, 2000. v. 2.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Agricultural Chemists**. 15. ed. Washington, 1990. v. 2.

ASQUIERI, E. R. et al. Fabricación de vino blanco y tinto de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg) utilizando la pulpa y la cáscara respectivamente. **Alimentaria**, Madrid, v. 355, n. 1, p. 97-109, 2004.

BARBOSA, C. D. **Obtenção de fermentado alcoólico e acético de manga (*mangifera indica* L.)**. 2014, 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BARNABÉ, D. **Produção de vinho de uvas dos cultivares Niágara rosada e bordô: análises físico-químicas, sensorial e recuperação de etanol a partir do bagaço**. 2006. 106f. Dissertação (Doutorado em agronomia) – Programa de pós-graduação em Ciências Agrônomicas da UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. The ‘buttery’ attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 235-252, Nov. 2004.

BENASSATI, H.; MARFIL, L. M.; OCCHIONERO, M. Acido acético: su capacidad desinfectante. **Acta Bioquím. Clin. Latinoam.**, Buenos Aires, v. 28, n. 3, p. 411-419, 1994.

BJORNSDOTTIR, K., BREIDIT JR., F., MCFEETERS, R.F. Protective effect of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, Raleigh, v. 72, p. 660–664, 2006.

BLACKBURN, C. W., MCCLURE, P. J. **Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis, and Control**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002.

BORTOLINI, F.; SANT’ANNA E. S.; TORRES R. C. Comportamento das Fermentações Alcoólica e Acética de Sucos de Kiwi (*Actinidia deliciosa*): Composição dos Mostos e Métodos de Fermentação Acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p.236-243, maio-ago. 2001.

BOTERO, A. **Aplicación de la ingeniería de matrices en el desarrollo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) mínimamente procesada fortificada con calcio y vitaminas C y E [Tesis de MSc]**. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica y Alimentos, 2008

BRANDÃO, C.C. **Desenvolvimento de fermentado alcoólico de yacon**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimento). Universidade Federal de Goiás, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução -Rdc nº 5, de 4 de fevereiro de 2013. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 de janeiro de 2013, Seção 1, p.43.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.6, de 3 de abril de 2012. Estabelece os padrões de identidade e qualidade e a classificação dos fermentados acéticos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 de abril de 2012, Seção 1, p. 16.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 36, de 14 de outubro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Fermentados Acéticos, conforme consta do Anexo desta Instrução Normativa Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

BRUL, S.; CROOTE, P. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanism. Int. **J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.50, p. 1–17, 1999.

BUCHANAN, R. L. et al. Influence of acidulant identify on the effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiol.**, London, v. 21, p. 51–57, 2004.

BUDAK, Havva N.; GUZEL-SEYDIM, Zeynep B. Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques, **Journal Science Food Agriculture**, New York, n.90 v. 12, p.2021-2026, jun. 2010.

CANTO, A. R. et al. **El cultivo de pitahaya em Yucatan**. Yucatán: Universidad Autonoma Chapingo, 1993. 53 p.

- CASTRO, A. M., RODRÍGUEZ, L., VARGAS, E. M. Secado de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) por aire caliente com pretratamiento de osmodeshidratación. **VITAE ± Revista de la Facultad de Química Farmacéutica.**, Medellín, v. 5, p. 226-231, 2008.
- CEREZO, Ana B. et al. Anthocyanin composition in Cabernet Sauvignon red wine vinegar obtained by submerged acetification, **Food Research International**, Barking, v. 43, n.6, p. 1577-1584, Jul.2010.
- CHANG T. C. Antioxidant and antimicrobial activities of commercial rice wine extracts of Taiwanese *Allium fistulosum*. **Food Chemistry**, Easton, v.190, p. 724–729, 2015.
- CHANG, J. M.; FANG, T. J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v. 24, p. 745-751, 2007.
- CHIARELLI, R. H. C.; NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. Fermentados de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg): processos de produção, características físico-químicas e rendimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 48, n. 4, p. 277-282, 2005.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliça: fisiologia e Manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 783 p.
- CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 137p. 2003. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.
- CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 4, ago. 2001.
- CRIVELLARO, C. G.; BARNABÉ, D. Vinho. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF / APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: E.Blücher, 2005. v.1, p.423-451.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, London, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009.

DIAS, D.R. et al. Elaboration of a fruit wine cocoa (*Thebroma cacao* L.) pulp. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.42, p.319-329, Mar. 2007.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 342-350, set./dez. 2003.

DUARTE, W. F. et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 43, n. 10, p. 1564-1572, Dec. 2010a

DUARTE, W. F. et al. Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 173-182, Oct. 2010b.

DUARTE, W. F. et al. Raspberry (*Rubus idaeus* L.) wine: yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 9, p. 2303-2314, Nov. 2010c.

DUARTE, W. F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabirola (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, Apr. 2009.

DUARTE, W. F. Fermentação espontânea e inoculada com *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA 1162 da polpa de gabirola para elaboração de bebida fermentada. Dissertação (mestrado em microbiologia agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, 2008.

ECHAVARRÍA, C. A.; YEPES, F. J.; TORRES, H. P.; Determinación del potencial antioxidante em extractos de vinagre *Guadua angustifolis* Kunth para aplicaciones alimenticias, **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Ciudad de la Habana, v. 4, n. 17, Out. 2012.

FANG, T. J., HSUEH, Y. T. Effect of chelators, organic acid and storage temperature on growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, using response surface methodology. **J. Food Drug Anal.**, Taiwan, v. 8, p. 187-194, 2000.

GARAGUSO I, NARDINI M. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. **Food Chemistry**, Easton, v. 179, p. 336-342, 2015.

GAWEL, R.; SLUYTER, S. van; WATERS, E. J. The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 13, n. 1, p. 38-45, 2007.

GRANADA, G. et al. Vinagres de folhas de videira: Aspectos sensoriais. **Boletim do Ceppa - Centro de Pesquisa e -Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 51-56, 2000.

GURAK, P. D.; BORTOLINI, F. Produção e aceitabilidade de fermentado de laranja no Alto Uruguai catarinense. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 132-140, 2010.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 2928-2935, 2005.

HIDALGO, C. et al. Effect of inoculation on strawberry fermentation and acetification processes using native strains of yeast and acetic acid bacteria. **Food Microbiology**, Amsterdam, n.34, v.1, p. 88-94, maio 2013.

ILHA, E.C. et al. Utilization of bee (*Apis mellifera*) honey for vinegar production. **Boletim CEPPA - Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.18 n.1, p. 39-50, 2000.

JAMILAH, B. Physico-chemical characteristics of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. **International Food Research Journal**, Malaysia, v. 18, n. 1, p. 279-286, 2011.

JANG, Y. K. et al. Comparison of traditional and commercial vinegars based on metabolite profiling and antioxidant activity. **J Microbiol Biotechnol**, Republic of Korea, v. 25, p.217-226, 2015.

JEFFERY, D. W.; WILKINSON, K. L. Wine. In: BAMFORT, C. W.; WARD, R. (Ed.). **The Oxford handbook of food fermentations**. Oxford: Oxford University, p. 54-147, 2014.

JIRAWAN, Y.; AND K. WARAWUT. Effect of Vapourized Fermented Vinegar on *Salmonella enteritidis* on Eggshell Surface. As. **J. Food Ag-Ind.**, Bangkok, v. 2, n. 4, p. 882-890, 2009.

KARAPINAR, M.; GONÜL, S., A. Effects of sodium bicarbonate, vinegar, acetic and citric acids on growth and survival of *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 343e347, 1992.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpa de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.45, p.1390-1393, 1997.

LEBEAU, T.; JOUENE, T.; JUNTER, G. A. Difusion of sugar and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cell. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, n. 6, p. 434-438, May 1998.

LICODIEDOFF, S.; KOSLOWSKI, L. A. D.; RIBANI, R. H. Flavonols and antioxidant activity of *Physalis peruviana* L. fruit at two maturity stages. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 35, n. 2, p. 393-399, 2013.

LIMA, C. A. et al. Caracterização físico-química e de compostos funcionais em frutos de pitaya. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. **Anais...** Natal: SBF, 2010. Disponível em:<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/865923>>. Acesso em: 28 dez 2015.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Bucher, 2001. v.3.

LIM, Y.Y.; LIM, T.T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. **Food Chemistry**, Oxford, v. 103, p.1003-8, 2007.

LOPES, R. V. V.; SILVA, F. L. H. Elaboração de fermentados a partir de figo-da-Índia. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, São Cristóvão, v. 6, n. 2, p. 305-315, 2006.

LU, S. F.; LEE, F. L.; CHEN, H. K. A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium acetobactersp. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 55-62, 1999.

MAEDA, R. N.; ANDRADE, J. S. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. **Acta Amaz**, Manaus, v.33, n.3, p. 489-498, 2003.

MAHATTANATAWEE, K. et al. Total antioxidant activity and fiber content of Select florida-grown tropical fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 19, p. 7355-7363, Aug. 2006.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemical Society**, St. Louis, v.45, p. 594-598, 1968.

MARQUES, F. P. P. et al. Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.1, n.30, p. 7, maio. 2010.

MASINO F. et al. A study on relationships among chemical, physical, and qualitative assessment in traditional balsamic vinegar, **Food Chemistry**, Oxford, v. 2, n. 106, p. 90-95, maio. 2008.

MATO, I.; LUQUE, S. S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, Barking, v. 38, n. 10, p. 1175-1188, Dec. 2005.

MEDINA, E. et al. Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, Oxford, v. 70, n. 5, p. 1194-1199, 2007.

MENDOZA, J. H.; RODRÍGUEZ DE S. A.; MILLÁN C. P. Caracterización físico química de la Uchuva (*Physalis peruviana*) en la región de Silvia Cauca. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, Popayán, v. 10, p. 188-196, 2012.

MOLINEROS J. R. B. et al. El empleo del ácido acético como antiséptico: un enfoque racional. **Rev.Colomb. Ortop. Traumatol.**, Santa de Bogotá, v. 5, n. 2, p. 117-124, 1991.

MORAES, M. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8.ed. Campinas: Unicamp, 1993.

MORETTO, E. et al. **Vinhos e vinagres: processamento e análise**. Florianópolis: UFSC, 1988.

MULERO, J.; PARDO F.; ZAFRILLA P. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, Espanha, v. 23, p. 569-574, set. 2010.

MUNIZ, C. R. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, v.20, n.2, p.309-322, 2002.

NARVAEZ-CUENCA, C. E.; MATEUS-GOMEZ, Á.; RESTREPO-SANCHEZ, L. P. Antioxidant capacity and total phenolic content of air-dried cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) at different ripeness stages. **Agron. colomb.**, Bogotá, v. 32, n. 2, Aug. 2014.

NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. NCCLS document M7-A6. Wayne: Pennsylvania, 2003.

NURGEL, C. et al. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on fermentation and flavor compounds of white wines made from cv. Emir grown in Central Anatolia, Turkey. **Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology**, Adana, v.29, p.28-23, 2002.

OLIVEIRA, M. E. S. et al. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, 2011.

PATO, O. **O vinho: sua preparação e conservação**. 7.ed. Lisboa: Livraria Clássica, 1982. (Coleção técnica agrária).

PEDROSO, P. R. F. **Produção de vinagre de maçã em biorreator Airlift**. 2003. 71 f. Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina (Centro Tecnológico Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Florianópolis, 2003.

PEYNAUD, E. **Conhecer e trabalhar o vinho**. Lisboa: LTC, 347p, 1982.

PESTANA, V.R. et al. Influência de diferentes variedades de hibisco na obtenção de vinagres semi-artesanais. In: XIII .CIC XII LP II MPG da UFPel, Pelotas. **Anais...** Pelotas, 2004

PINTO, T. M. S. et al. Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida* spp. in complete denture wearers. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v.16, p. 385 e 390, 2008.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 106 f. Dissertação. ESALQ/USP, 2009.

QI, Z., A Protocol for Optimization Vinegar Fermentation According to the Ratio of Oxygen Consumption Versus Acid Yield. **Journal of Food Engineering**, China, v. 116, p. 304-309, 2013.

RAMADAN, M. F.; MOERSEL. Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 452-460, 2007.

REMIZE, F.; SABLAYROLLES, J.M.; DEQUIN, S. Re-assessment of the influence of yeast 30 strain and environmental factors on glycerol production in wine. **J Appl Microbiol.**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 371-378, 2000.

RHEE, M.S. et al. Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, p. 2959–2963, 2003.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. Sistema de produção de vinagre. Bento Gonçalves: Embrapa, 2006.

ROCKENBACH, I. I. et al. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alimento e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 3, p. 271-276, 2008a.

ROCKENBACH, I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannate Ancelota. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 238-244, 2008b.

- RODRIGUES, L. J. **Desenvolvimento e processamento mínimo de pitaia nativa (*Selenicereus setaceus* Rizz.) do cerrado brasileiro**. 2010. 164 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia Científica**: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical., 2007. (Comunicado Técnico, 127).
- RUFINO, M. S. M et al. **Metodologia Científica**: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007 b. (Comunicado Técnico, 127)
- SAHA, P.; BANERJEE, S. Optimization of process parameter for vinegar production using banana fermentation, **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 2, n. 9, p.501-514. set. 2013.
- SANTOS, C. S. et al. Elaboração e análise sensorial do fermentado de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, p. 47-50, mar. 2005.
- SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; SILVA JÚNIOR, J.J. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.79, p.89-96, 2001.
- SENGUN, I. Y., KARAPINAR, M. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). **Intl J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 96, p. 301–5, 2004.
- SEVERO, J. et al. Atividade antioxidante e fitoquímicos em frutos de *Physalis peruviana*, L.) durante o amadurecimento e o armazenamento. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 16, n. 1-4, p. 77-82, 2010.
- SHAH, Q. A.; BIBI, F.; SHAH, A. H. Anti-Microbial Effects of Olive Oil and Vinegar against *Salmonella* and *Escherichia coli*. **The Pacific Journal of Science and Technology**, Hilo, v 14, p. 479- 486, 2013.
- SILVA, M. E. et al. Cashew Wine Vinegar Production: Alcoholic and Acetic Fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Campina Grande, v. 24, n. 02, p. 163-169, abr./jun. 2007.

STINTZING, F. C. et al. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. **Phytochemistry**, New York, v. 65, p. 415-422, 2004.

SUMAN, A. P. **Processo de obtenção de vinagre de gengibre**. 2012. 97p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de ciências agrônômicas – campus de Botucatu (UNESP). Botucatu, SP, 2012.

SU, M. S.; CHIEN, J.; Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. **Food Chemistry**, Oxford, n.104, p.182-187, jun.2007.

SU, M.S.; SILVA, J. L. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation. **Food Chemistry**, Oxford, v.97, n.3, 2005.

TENOREA G, C; NOVELLINO E; BASILE, A. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. **Journal of Functional Foods.**, New York, v. 4, n. 1, p.129-136, jan. 2012.

TESSARO, D. et al. Avaliação das fermentações alcoólica e acética para produção de vinagre a partir de suco de laranja. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 201-205, 2010.

TORRES NETO, A. B. T. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.3, p.489-492, 2006.

UBEDA, A. et al. Employment of different processes for the production of strawberry vinegars: Effects on antioxidant activity, total phenols and monomeric anthocyanins C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 52,p. 139-145, 2013.

VAILLANT, F. et al. Colorant and antioxidant properties of red-puple pitahaya (*Hylocereus sp.*). **Fruits**, Paris, v. 60, n. 1, p. 1-7, Jan./Feb. 2005.

VOLSCHENKLA, H.; VUUREN, H. J. J. M. van; VILJOEN-BLOOM, M. Malic acid in wine: origin, function and metabolism during vinification. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 27, n. 2, p. 123-136, 2006.

WANG, A.; ZHANG, J.; LI, Z. Correlation of volatile and nonvolatile components with the total antioxidant capacity of tartary buckwheat vinegar: Influence of the thermal processing. **Food Research International**, Barking, v. 49, p. 65–71, 2012.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics, Handbook of food analytical chemistry. **Unt I 1.1: Polyphenolics**, Wiley, New York, p. 464–465, 2001.

WEN-QIAO, W. Fungicidal activity of bamboo vinegar against several phytopathogenic fungi. **Acta Phytopathologica Sinica**, Beijing, v. 35, n. 6, p. 99 e 104, 2005.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 82, p. 84–92, 1976.

WU, L.C. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, Oxford, v. 95, p.319–327, 2006.

WU, F.M. et al. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.63, p. 568–572, 2000.

YALCIN, S. K.; OZBAS, Y. Z. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 325–332, 2008.

YILDIZ, G. et al. Physical and chemical characteristics of goldenberry fruit (*Physalis peruviana* L.). **Journal Food Science Technology**. London, v.52, n.6, p.2320–2327, 2015.

ZHANG, Y. J. Chemical Components and Bioactivities of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana*). **International Journal of Food Nutrition and Safety**, Florida, v. 3, p. 15–24, 2013.

ZILIOLI, E. **Composição química e propriedades funcionais no processamento de vinagres**. 2011. 98f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas Campinas: UNICAMP, 2011.