

**VANESSA BEATRIZ VAZ HORTA DA SILVA**

**PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-  
QUÍMICAS DE PRODUTOS ACETIFICADOS  
OBTIDOS DE FRUTOS FERMENTADOS**



**2022**

**VANESSA BEATRIZ VAZ HORTA DA SILVA**

**PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-  
QUÍMICAS DE PRODUTOS ACETIFICADOS  
OBTIDOS DE FRUTOS FERMENTADOS**

Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Célia Quintas

Professora Doutora Patrícia Nunes



**UA**lg ISE

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA

**2022**

# Propriedades Microbiológicas e Físico-químicas de Produtos Acetificados obtidos de Frutos Fermentados

## Declaração de Autoria de Trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

© 2022 Vanessa Beatriz Vaz Horta da Silva, ISE/UAlg e UAlg

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

## **Agradecimentos**

Finalizada esta etapa tão desafiante da minha vida, gostaria de agradecer a todos os que, de algum modo, contribuíram para a sua conclusão.

À Professora Doutora Célia Maria Brito Quintas, por ter aceitado ser minha orientadora, pela dedicação, motivação, ensinamentos, disponibilidade e amizade transmitidos ao longo de todo este percurso tão desafiante, em que a resiliência de todos nós foi constantemente posta à prova.

À Professora Doutora Patrícia Alexandra Reis Nunes pelo apoio, assistência, palavras de conforto e amizade tão importantes nas etapas mais difíceis desta caminhada.

Ao Professor Doutor Eduardo Esteves, pelo incentivo constante e também, pela colaboração e disponibilidade na melhoria da apreciação estatística dos dados envolvidos na minha tese.

Às técnicas de laboratório Engenheiras Clarisse Ramalho, Neusa Rodrigues e Vera Gonçalves, por me terem recebido tão bem, pelos conhecimentos transmitidos e ajuda permanente.

Aos colegas que partilharam esta jornada comigo pela sua amizade e companhia, nomeadamente à minha parceira Gisou, à querida Ana Paula e ao sempre atencioso Diogo.

Aos amigos especiais que me apoiaram incondicionalmente e me deram forças para nunca desistir - Diana, Rui, Andreia, Violeta, Catarina e pela presença e carinho constantes, ao Silvestre e Tobias.

E, em último mas não menos especial, aos meus queridos pais por toda a força que me transmitiram nos momentos mais difíceis, por acreditarem sempre em mim, pela paciência, motivação, compreensão e amor incondicional. Obrigada por todo o carinho, não só na realização deste trabalho, como também em todas as etapas da minha vida.

## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo estudar as características de produtos acetificados, nomeadamente de vinagres dos frutos fermentados ameixa e framboesa, e ainda de cerveja e gengibre. Estes produtos foram processados pelo método de Orleans e engarrafados numa empresa do Algarve. Procedeu-se à sua caracterização físico-química (pH, acidez total, °Brix, cor, teor de compostos fenólicos e flavonoides, e atividade antioxidante) e microbiológica (contagens de microrganismos mesófilos, bactérias ácido-láticas, fungos filamentosos, leveduras e bactérias acéticas). Estudou-se ainda a atividade antimicrobiana dos vinagres contra bactérias e leveduras utilizando o método da difusão em agar. O vinagre de framboesa foi o que apresentou valores mais elevados de pH (3,30), acidez ( $6,82 \pm 0,06$  g/100 ml), e compostos flavonoides ( $161,64 \pm 11,25$  mg catequina/100 ml). O vinagre de ameixa possuía o nível mais baixo de acidez ( $5,25 \pm 0,17$  g/100 ml) e o de gengibre menores quantidades de compostos fenólicos ( $0,25 \pm 0,01$  mg ácido gálico/100 ml) e flavonoides ( $50,73 \pm 12,54$  mg catequina/100 ml). A atividade antioxidante mais alta foi detetada no vinagre de framboesa ( $0,28 \pm 0,02$  DPPH, mg Trolox/100 ml) seguida do de cerveja ( $0,04 \pm 0,00$  DPPH, mg Trolox/100 ml) que apresentou o maior conteúdo em compostos fenólicos ( $0,62 \pm 0,06$  mg ácido gálico/100 ml) e pH menor ( $2,77 \pm 0,03$ ). As amostras estudadas apresentaram uma elevada qualidade microbiológica pois as contagens realizadas estavam todas abaixo de 1 UFC/ml. Os vinagres revelaram uma capacidade de inibição do crescimento das bactérias superior à detetada nas leveduras. O crescimento das leveduras, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*, não foi inibido pelos vinagres estudados. As enterobactérias *Cronobacter sakazakii* e *Salmonella* Typhimurium foram as mais tolerantes aos vinagres ( $10,00 \pm 0,00$  -  $17,33 \pm 4,18$  mm), enquanto *Pseudomonas aeruginosa* foi a bactéria mais sensível ( $28,40 \pm 3,21$  -  $39,00 \pm 1,00$  mm) assim como as Gram + (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus epidermidis*) ( $23,80 \pm 2,39$ - $30,50 \pm 1,00$  mm). A maior atividade antimicrobiana foi detetada nos vinagres de framboesa e gengibre provavelmente devido à elevada acidez.

**Palavras-chave:** produtos acetificados; vinagre; parâmetros físico-químicos e microbiológicos; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana.

## Abstract

The present work aimed to study the characteristics of acetified products, namely vinegars of fermented plum and raspberry fruits, as well as beer and ginger. These products were processed by the Orleans method and bottled in a company in the Algarve. Physicochemical characterization (pH, total acidity, °Brix, color, content of phenolic and flavonoid compounds, and antioxidant activity) and microbiological (counts of mesophilic microorganisms, lactic acid bacteria, filamentous fungi, yeasts and acetic bacteria) were performed. The antimicrobial activity of vinegars against bacteria and yeasts was also studied using the agar diffusion method. Raspberry vinegar had the highest values in pH (3.30), acidity ( $6.82 \pm 0.06$  g/100 ml), and flavonoid compounds ( $161.64 \pm 11.25$  mg catechin/100 ml). Plum vinegar had the lowest level of acetic acid ( $5.25 \pm 0.17$  g/100 ml) and ginger vinegar was characterized by having smaller amounts of phenolic compounds ( $0.25 \pm 0.01$  mg gallic acid/100 ml) and flavonoids ( $50.73 \pm 12.54$  mg catechin/100 ml). The highest antioxidant activity was detected in raspberry vinegar ( $0.28 \pm 0.02$  DPPH, mg Trolox/100 ml) followed by beer ( $0.04 \pm 0.00$  DPPH, mg Trolox/100 ml) which presented the highest content of phenolic compounds ( $0.62 \pm 0.06$  mg gallic acid/100 ml) and lower pH ( $2.77 \pm 0.03$ ). The samples showed a high microbiological quality since the microbial counts performed were all below 1 CFU/ml. The vinegars showed an ability to inhibit the growth of bacteria superior to that measured in yeasts. Some yeasts namely a strain of *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*, were not inhibited by the vinegars. The enterobacteria *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* Typhimurium were the most tolerant ( $10.00 \pm 0.00$  -  $17.33 \pm 4.18$  mm), while *Pseudomonas aeruginosa* was the most sensitive bacteria ( $28.40 \pm 3.21$  -  $39.00 \pm 1.00$  mm) as well as Gram + (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus epidermidis*) ( $23.80 \pm 2.39$  -  $30.50 \pm 1.00$  mm). Raspberry and ginger vinegars induced the greatest antimicrobial activity which may be related to the high acidity content.

**Keywords:** acetified products; vinegar; physicochemical and microbiological parameters; antioxidant activity; antimicrobial activity.

# Índice Geral

Declaração de Autoria de Trabalho .....	iii
Agradecimentos .....	iv
Resumo .....	v
Abstract.....	vi
Índice Geral .....	vii
Índice de Figuras .....	ix
Índice de Tabelas .....	xi
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento Histórico .....	1
1.2 Enquadramento Legislativo .....	3
1.3 Caraterísticas do Vinagre .....	7
1.4 Propriedades Benéficas do Vinagre .....	8
1.5 Matérias Primas .....	11
1.5.1 Frutos Fermentados .....	12
1.6 Microrganismos Envolvidos no Processamento do Vinagre .....	12
1.6.1 Bactérias Acéticas.....	13
1.6.2 Bactérias Ácido-Láticas .....	16
1.6.3 Leveduras.....	17
1.7 Fermentação Alcoólica e Acetificação .....	18
1.8 Processos de Acetificação.....	21
1.8.1 Apreciação Comparativa dos Diferentes Processos Tecnológicos.....	22
1.8.2 Método Lento (de Orleans).....	22
1.8.3 Método Rápido (de Schutzenbach) .....	25
1.8.4 Método de Acetificação Submersa (de Frings) .....	26
1.9 Operações de Acabamento.....	28
1.10 Objetivos.....	30
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
2.1 Amostras .....	30
2.2 Parâmetros Físico-Químicos .....	30
2.2.1 Determinação do pH.....	31

2.2.2	Determinação da Acidez Total .....	31
2.2.3	Determinação do °Brix .....	32
2.2.4	Determinação da Densidade .....	32
2.2.5	Determinação da Cor .....	32
2.2.6	Determinação dos Compostos Fenólicos Totais.....	33
2.2.7	Determinação dos Compostos Flavonoides Totais.....	33
2.2.8	Determinação da Atividade Antioxidante .....	34
2.3	Parâmetros Microbiológicos .....	35
2.3.1	Avaliação da Qualidade Microbiológica .....	35
2.4	Estudo da Atividade Antimicrobiana.....	37
2.5	Análise Estatística.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
3.1	Parâmetros Físico-Químicos .....	39
3.1.1	Caraterísticas Físico-Químicas dos Vinagres .....	39
3.1.2	Bioatividade dos Vinagres.....	41
3.1.3	Propriedades da Cor dos Vinagres.....	43
3.2	Parâmetros microbiológicos: Avaliação da Qualidade dos Vinagres .....	44
3.3	Estudo da Atividade Antimicrobiana.....	47
3.3.1	Efeito dos Vinagres em Bactérias.....	47
3.3.2	Efeito dos Vinagres em Leveduras .....	56
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO .....	63
5	PERSPETIVAS DE TRABALHOS FUTUROS .....	64
6	REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS .....	65

## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Esquema da via metabólica da fermentação alcoólica. Adaptado de Rodrigues <i>et al.</i> (2018) .....	19
Figura 1.2 - Reações de oxidação em membrana biológica. Adaptado de Hutkins (2018) .....	20
Figura 1.3 - Ilustração das etapas envolvidas na produção de vinagre. Adaptado de Hutchinson <i>et al.</i> (2019).....	21
Figura 1.4 - Ilustração esquemática do barril usado no método de Orleans. Adaptado de Hutkins (2018).....	23
Figura 1.5 - Ilustração de corte transversal de barril frequentemente utilizado para a produção de vinagre pelo método de Orleans. Adaptado de Aquarone <i>et al.</i> (2001) .....	24
Figura 1.6 - Ilustração de gerador utilizado no processo rápido para a produção de vinagre Adaptado de Aquarone <i>et al.</i> (2001) .....	26
Figura 1.7 - Ilustração de um acetificador para a produção de vinagre pelo método de acetificação submersa: a) turbina de ar; b) compensador de ar; c) dispositivo para coletar líquido de condensação; d-e) dispositivo para controlar a formação de espuma; f) dispositivo para medir o álcool; g) serpentina para refrigeração; h) dispositivo para refrigeração; i) termómetro; j) bomba para entrada do vinho; k) bomba para retirada do vinagre. Adaptado de Veloso (2013).....	27
Figura 3.1 - Efeito da penicilina em <i>S. aureus</i> .....	48
Figura 3.2 - Efeito da penicilina em <i>E. coli</i> .....	48
Figura 3.3 - Efeito da eritromicina em <i>L. innocua</i> .....	49
Figura 3.4 - Efeito do cloranfenicol em <i>S. epidermidis</i> .....	49
Figura 3.5 - Efeito do vinagre de ameixa em <i>S. epidermidis</i> .....	51
Figura 3.6 - Efeito do vinagre de ameixa em <i>C. sakazakii</i> .....	51
Figura 3.7 - Efeito do vinagre de cerveja em <i>P. aeruginosa</i> .....	52
Figura 3.8 - Efeito do vinagre de cerveja em <i>S. Typhimurium</i> .....	52
Figura 3.9 - Efeito do vinagre de gengibre em <i>P. aeruginosa</i> .....	53
Figura 3.10 - Efeito do vinagre de gengibre em <i>C. sakazakii</i> e <i>S. Typhimurium</i> .....	53
Figura 3.11 - Efeito do vinagre de framboesa em <i>S. Typhimurium</i> .....	54
Figura 3.12 - Efeito do vinagre de framboesa em <i>P. aeruginosa</i> .....	54
Figura 3.13 - Efeito do fluconazol em <i>D. hansenii</i> .....	57

Figura 3.14 - Efeito do fluconazol em <i>S. cerevisiae</i> .....	58
Figura 3.15 - Efeito da nistatina em <i>C. albicans</i> (ATCC 10231).....	58
Figura 3.16 - Efeito da anfotericina B e nistatina em <i>D. hansenii</i> .....	59
Figura 3.17 - Efeito dos vinagres de ameixa e cerveja em <i>P. membranaifaciens</i> .....	60
Figura 3.18 - Efeito do vinagre de framboesa em <i>D. hansenii</i> .....	61
Figura 3.19 - Efeito do vinagre de framboesa em <i>C. albicans</i> (ATCC 90028).....	61

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Classificação de vinagres (Decreto-Lei nº 174/2007).....	4
Tabela 1.2 - Processamento de vinagre: substâncias permitidas e inibidas (Decreto-Lei nº 174/2007) .....	5
Tabela 1.3 - Processamento de vinagre: operações tecnológicas admitidas (Decreto-Lei nº 174/2007) .....	6
Tabela 1.4 - Parâmetros físico-químicos exigíveis para comercialização de vinagres (Decreto-Lei nº 174/2007).....	7
Tabela 1.5 - Composição nutricional do vinagre (INSA- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, USDA- “National Nutrient Database for Standard Reference”).....	8
Tabela 1.6 - Principais propriedades dos géneros <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> e <i>Komagataeibacter</i> . Adaptado de Gomes <i>et al.</i> (2018).....	15
Tabela 1.7 - Comparação entre processos de acetificação. Adaptado de Aquarone <i>et al.</i> (2001) .....	22
Tabela 3.1 - Caraterísticas físico-químicas dos diferentes vinagres.....	40
Tabela 3.2 - Bioatividade dos diferentes vinagres.....	41
Tabela 3.3 - Parâmetros de cor dos diferentes vinagres .....	43
Tabela 3.4 - Contagem (UFC/ml) dos microrganismos nos diferentes vinagres (n=3)..	45
Tabela 3.5 - Atividade antimicrobiana dos antibióticos contra as bactérias (n=6) .....	47
Tabela 3.6 - Atividade antimicrobiana dos diferentes vinagres contra as bactérias (n=6) .....	50
Tabela 3.7 - Atividade antimicrobiana dos antimicóticos contra as leveduras (n=6)....	57
Tabela 3.8 - Atividade antimicrobiana dos diferentes vinagres contra as leveduras (n=6) .....	59

## Lista de Abreviaturas e Siglas

°h	Tonalidade da cor
a*	Gradação da cor verde (-100) a vermelho (+100)
A.C.	Antes de Cristo
Abs	Absorvância
ANOVA	Análise de variância
Artº	Artigo
b*	Gradação da cor azul (-100) a amarelo (+100)
BA	Bactérias Acéticas
BAA	Acid Acetic Bacteria Medium
BAL	Bactérias ácido-lácticas
C*	Saturação ou vivacidade da cor
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol
Eq.	Equação
Fig.	Figura
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISO	International Organization for Standardization
L*	Luminosidade, variando de preto (0) a branco (+100)
ME	Malt Extract Agar
MMA	Microrganismos mésofilos aeróbios
MRS	Man Rogosa and Sharpe Agar
NP	Norma Portuguesa
PCA	Plate Count Agar
Pe.	Por exemplo
PET	Polietileno Tereftalato
PVC	Policloreto de vinilo
Séc.	Século
UFC	Unidade Formadora de Colónias
USDA	United States Department of Agriculture

# 1 INTRODUÇÃO

A origem de produtos acetificados como o vinagre está, certamente, ligada ao vinho pois sendo um subproduto alimentar resultante da sua deterioração, se for exposto ao ar, rapidamente acidifica e se transforma em “vinho azedo”, sendo possível reconhecê-lo tanto pelo seu cheiro quanto pelo seu sabor (Ho *et al.*, 2017; Bourgeois e Barja, 2009), apresentando propriedades muito diversas nomeadamente, de conservação, de condimentação, aromatização, terapêuticas e antimicrobianas, existindo referências ao seu uso na medicina tradicional, ou mesmo na indústria alimentar, como conservante (Quintana *et al.*, 2021; Budak *et al.*, 2014). Desde a antiguidade que o “*Vinum acre*” ou “*Vinum acetum*”, conhecido como vinagre, faz parte da alimentação humana existindo inclusivamente, referências ao seu uso para outros fins (Solieri e Giudici, 2009).

## 1.1 Enquadramento Histórico

De acordo com Johnston e Gaas (2006), a primeira utilização, conhecida, do vinagre ocorreu há mais de 10.000 anos, julgando-se que os Egípcios, Sumérios e Babilónios já conheciam a versatilidade deste produto, evidenciando experiência e conhecimentos na sua produção a partir de diversos tipos de frutos (Solieri e Giudici, 2009).

O vinagre era bastante popular na Grécia e Roma antigas, sendo usado na preparação de alimentos e como remédio contra um grande número de doenças. Já na Ásia os primeiros registos sobre o vinagre remontam à dinastia Zhou (1027-221 A.C.) e, provavelmente, os antigos vinhos de arroz da China podem ter tido a sua origem em frutas, sendo posteriormente substituídos por arroz (Solieri e Giudici, 2009).

Referências no Antigo Testamento e em Hipócrates (460-377 A.C.) indicam o uso de vinagre para a higienização e tratamento de ulcerações e feridas (Johnston e Gaas, 2006) e no séc. VIII, os guerreiros Samurais do Japão usavam-no como um tónico, pois acreditavam que este lhes dava poder e força (Ho *et al.*, 2017).

No séc. XVIII, médicos norte-americanos usavam vinagre para aliviar alguns sintomas, como febre alta, dor de estômago e edema (Tan, 2005) e Durande, químico francês,

produziu, com sucesso, um ácido acético glacial através de um concentrado de vinagre (Ho *et al.*, 2017).

Já no séc. XIX na Alemanha, Schutzenbach desenvolveu uma técnica de fabricação de vinagre que permitia que o produto fosse produzido em sete dias, sendo por esta razão, designado por método rápido (Ho *et al.*, 2017). Anteriormente ao desenvolvimento deste método, o vinagre era produzido através do método clássico de Orleans, o qual requeria várias semanas até à obtenção do produto final desejado. Esta forma de processamento, por oposição ao de Schutzenbach, também é designada por método lento.

No séc. XX e também na Alemanha, Hromatka desenvolveu um método mais sofisticado de produção de vinagre, designado por acetificação submersa, com um sistema de arejamento e agitação melhorado, de modo a produzir vinagre num período de tempo mais curto (Bourgeois e Barja, 2009).

Não obstante a produção de vinagre remontar à antiguidade, os primeiros tratados relativamente à sua produção referem-se ao séc. VIII. Jabir Ibn Hayyan, mais conhecido pelo nome latino Geber, também denominado como “Pai da Química”, efetuou um estudo intensivo dos produtos acetificados, devendo-se a ele a descoberta do ácido acético, através da destilação daquele produto (Solieri e Giudici, 2009).

No séc. XVIII, aprofundando os seus conhecimentos químicos, Antoine Laurent de Lavoisier, identificou a importância do oxigénio na formação do vinagre. Registou uma experiência sobre a fermentação alcoólica de uma solução de açúcar, observando a presença de vinagre juntamente com álcool, açúcar, leveduras, água e dióxido de carbono. Desta experiência concluiu que o oxigénio era o agente de transformação do vinho em vinagre, devido à sua exposição ao ar (Solieri e Giudici, 2009).

No séc. XIX, Pasteur comprova que o processo de fermentação é causado pelo crescimento de microrganismos e esse mesmo crescimento é causado pelo contacto com o oxigénio. No seu trabalho com leveduras, concluiu que apesar do ar não fazer parte do processo de fermentação do vinho, o mesmo era essencial para a produção do vinagre e que, as bactérias *Acetobacter aceti*, oxidam o álcool em ácido acético. Assegurou ainda, que a produção de vinagre podia ser melhorada pela adição de uma quantidade de microrganismos à mistura de fermentação (Solieri e Giudici, 2009).

Ao longo do Renascimento, a indústria do vinagre floresceu e originou vinagres variados, com base em matérias-primas diversas, como as especiarias, as ervas, as frutas e até mesmo as flores (Bourgeois e Barja, 2009).

Nos dias de hoje, o vinagre é principalmente utilizado, para fins alimentares, como na preparação industrial e/ou caseira de molhos (*ketchup*, mostarda, maionese, vinagretes, entre outros), marinadas e conservas (como por exemplo *pickles* e escabeche) (Costa, 2014).

## **1.2 Enquadramento Legislativo**

O Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio, define as características e classificação do vinagre destinado à alimentação humana, estabelece as respetivas regras de acondicionamento e rotulagem e descreve o vinagre como “*produto obtido exclusivamente pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de produtos de origem agrícola*”.

Com vista à produção de produtos acetificados, impõe-se a utilização de matérias-primas em conveniente estado de conservação, isentas de substâncias estranhas à sua composição, e de microrganismos patogénicos ou de substâncias em níveis prejudiciais à saúde do consumidor.

Em conformidade com disposto no Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio de 2007, quanto à sua origem, os vinagres podem classificar-se em nove tipos (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Classificação de vinagres (Decreto-Lei nº 174/2007)

<b>Tipo de Vinagre</b>	<b>Processo de Obtenção</b>
<b>Vinagre de vinho</b>	Acetificação exclusivamente do vinho;
<b>Vinagre de fruta e vinagre de bagas</b>	Fermentação alcoólica e acetificação da fruta ou bagas;
<b>Vinagre de sidra</b>	Acetificação da sidra;
<b>Vinagre de álcool</b>	Acetificação do álcool destilado de origem agrícola;
<b>Vinagre de cereais</b>	Dupla fermentação alcoólica e acetificação, sem destilação intermédia;
<b>Vinagre de malte</b>	Dupla fermentação alcoólica e acetificação, sem destilação intermédia de cevada maltada, com ou sem adição de cereais;
<b>Vinagre de malte destilado</b>	Destilação do vinagre de malte, sob pressão reduzida, contendo apenas os constituintes voláteis do vinagre de malte de que deriva;
<b>Outros vinagres</b>	Dupla fermentação de vinagres de outros produtos de origem agrícola não contemplados nos itens anteriores, nomeadamente, de mel, de cerveja, entre outros;
<b>Vinagres aromatizados e vinagres com especiarias</b>	Os vinagres referidos nos itens anteriores, aos quais sejam adicionadas plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes, que sejam organolepticamente perceptíveis.

Ao longo do processamento do vinagre é permitida e inibida a adição de algumas substâncias, que são apresentadas na tabela 1.2. Contudo, conforme dispõe o artº 8º, do Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio de 2007, são admitidos agentes de filtração, de clarificação e de acabamento aprovados para os vinhos e, em caso de necessidade de multiplicação de acetobactérias, também, preparações de malte, amido líquido, glucose, fosfatos e sais de amónio.

Tabela 1.2 - Processamento de vinagre: substâncias permitidas e inibidas (Decreto-Lei nº 174/2007)

<b>Ingredientes Facultativos</b>	<b>Substâncias Proibidas</b>
Plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes;	Aromatizantes artificiais;
Sumos de fruta ou concentrados dos mesmos;	Óleos de grainha de uva, naturais ou artificiais;
Mel;	Resíduos de destilação, resíduos de fermentação ou os seus subprodutos;
Açúcar;	Substâncias extraídas de bagaço (todos os tipos);
Sal.	Ácidos de todos os tipos, com exceção daqueles naturalmente contidos nas matérias-primas utilizadas ou contidos em qualquer substância cuja adição nestas seja permitida, como sejam, designadamente, os aditivos.

No âmbito do processo de produção de vinagre, conforme estabelece o artº 9º, são permitidas as operações tecnológicas constantes da tabela 1.3.

Tabela 1.3 - Processamento de vinagre: operações tecnológicas admitidas (Decreto-Lei nº 174/2007)

<b>Operações Tecnológicas</b>
Mistura de vinhos;
Diluição dos produtos alcoólicos com água potável;
Diluição dos vinagres com água potável;
Acetificação rápida por meio de corrente de ar, oxigénio ou aquecimento e o emprego dos mesmos meios para o seu envelhecimento;
Descoloração dos vinhos, outros líquidos alcoólicos e dos próprios vinagres com carvões descolorantes;
Clarificação;
Trasfega, separação líquido-sólido e líquido-líquido e refrigeração;
Coloração com caramelo;
Esterilização e pasteurização.

Quanto ao acondicionamento, o vinagre destinado ao consumidor final deve apresentar-se pré-embalado, podendo encontrar-se a granel quando se destine a indústrias grossistas ou similares e, no que se refere ao material usável em contacto com o vinagre, deve o mesmo ser impermeável, inerte e inócuo, bem como garantir a adequada conservação do produto. Já a rotulagem deve obedecer aos requisitos previstos no artº 11º, do Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio de 2007.

No que diz respeito ao processo de comercialização, os limites mínimos e máximos de acidez total e de álcool residual têm de ser observados em conformidade com os parâmetros apresentados na tabela 1.4.

Tabela 1.4 - Parâmetros físico-químicos exigíveis para comercialização de vinagres (Decreto-Lei nº 174/2007)

<b>Acidez Total (em ácido acético)</b>	<b>Limite Mínimo</b>	<b>Limite Máximo</b>
Vinagre de Vinho	6 g/ 100 ml	-
Outros	5 g/ 100 ml	-
<b>Álcool Residual (a 20 °C)</b>		
Vinagre de Vinho	-	1,5% v/v
Outros	-	0,5% v/v

### 1.3 Características do Vinagre

Os produtos acetificados resultam da fermentação alcoólica de substratos açucarados, designadamente de frutos, realizada por leveduras, seguindo-se a conversão do etanol em ácido acético levada a cabo por bactérias acéticas, denominando-se este processo por acetificação.

Para além de ácidos orgânicos, estes produtos contêm outros compostos de fermentação, tais como os ésteres, as cetonas e os aldeídos, os quais estão associados ao flavor e à cor, sendo que estes produtos possuem também substâncias com outras propriedades biológicas - (antimicrobianas e antioxidantes), que podem ter origem na matéria-prima ou surgir durante o processamento (Hutkins, 2018). Por seu lado, independentemente do substrato alcoólico precedente, o ácido acético é o componente principal dos vinagres, devendo a sua concentração ser expressa em gramas de ácido acético por 100 mL de vinagre (Suman, 2012).

Define-se então, que os vinagres não devem apresentar um teor de etanol superior a 0.5% (v/v), devem conter pelo menos 4% de ácido acético e apresentar um valor de pH entre 2 e 3,5 (Hutkins, 2018), assim como em conformidade com o disposto no Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio de 2007, a acidez total do vinagre de vinho não poderá ser inferior a 6 g/100 mL (6%), expressa em ácido acético seco (isento de água) e a acidez total dos outros tipos de vinagre não poderá ser inferior a 5 g/100 mL (5%).

De acordo com as tabelas de composição nutricional do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA - <http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?21017>) e a National Nutrient Database for Standard Reference (USDA - <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food->

details/1102778/nutrients), a composição nutricional do vinagre (100 g), de forma comparada e considerando apenas os componentes com representatividade comum, está sintetizada na tabela 1.5.

Tabela 1.5 - Composição nutricional do vinagre (INSA- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, USDA- “National Nutrient Database for Standard Reference”)

Componentes	INSA	USDA
	<small>(<a href="http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?21017">http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?21017</a>)</small>	<small>(<a href="https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1102778/nutrients">https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1102778/nutrients</a>)</small>
Energia	22,00 kcal	21,00 kcal
Água	93,00 g	93,81 g
Proteína	0,30 g	0,00 g
Açúcares	0,60 g	0,40 g
Cálcio (Ca)	14,00 mg	7,00 mg
Potássio (K)	57,00 mg	73,00 mg
Sódio (Na)	16,00 mg	5,00 mg
Fósforo (P)	6,00 mg	8,00 mg
Magnésio (Mg)	5,00 mg	5,00 mg
Ferro (Fe)	0,30 mg	0,20 mg
Zinco (Zn)	0,10 mg	0,04 mg

#### 1.4 Propriedades Benéficas do Vinagre

De acordo com alguns autores, o consumo regular de vinagre apresenta alguns efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente na digestão, estimulação do apetite, propriedades antioxidantes, recuperação de exaustão, redução do teor de lípidos e regulação da pressão arterial (Ho *et al.*, 2017). Apontam-se ainda, como principais propriedades terapêuticas funcionais a atividade antibacteriana, a redução dos efeitos da diabetes, a prevenção de doenças cardiovasculares e o aumento da energia após o exercício físico (Budak *et al.*, 2014). Diversos estudos mostraram que o ácido acético pode prevenir a digestão completa dos hidratos de carbono complexos, aumentando a captação da glicose pelos tecidos, resultando numa redução dos níveis de glicose no sangue (Ho *et al.*, 2017).

Os produtos acetificados como o vinagre contêm polifenóis, que demonstraram prevenir a peroxidação lipídica, a hipertensão, a hiperlipidemia, a inflamação, cancro e mesmo, a hipertensão (Ho *et al.*, 2017; Dávalos *et al.*, 2005).

Os microrganismos responsáveis pela fermentação acética do vinagre produzem, além do ácido acético, diversos compostos metabólicos que modificam o sabor do produto. Alguns vinagres, como o balsâmico e de frutas, em geral, são conhecidos por conterem antioxidantes, compostos anti tumorais e outros metabólitos bioativos que podem ser responsáveis por efeitos benéficos na saúde (Solieri e Giudici, 2009).

Estudos recentes têm sugerido que compostos bioativos, como polifenóis e vitaminas, altamente disponíveis nos vinagres, podem minimizar a incidência de doenças degenerativas, proporcionando efeitos antioxidantes e alguns trabalhos têm demonstrado benefícios no tratamento de diabéticos pois, o vinagre pode melhorar a sensibilidade à insulina no ser humano, já que, a curva de resposta à insulina é diminuída em 20 % após o consumo de sacarose co-administrada com vinagre (Ho *et al.*, 2017).

Para a indústria alimentar o vinagre apresenta uma série de funcionalidades, devido à sua capacidade de reduzir o pH dos alimentos, inibindo o crescimento de bactérias, prevenindo o crescimento de fungos, desinfetando os equipamentos e neutralizando odores desagradáveis de alguns alimentos (Pazuch *et al.*, 2015).

O seu potencial antioxidante depende da presença de vários compostos bioativos, como os ácidos fenólicos e flavonoides, que têm origem na variedade de fruta utilizada como matéria-prima, podendo o mesmo ser influenciado pelas diferentes técnicas de processamento (Bakir *et al.*, 2017).

O vinagre tem sido usado como um agente antifúngico e antibacteriano devido ao seu pH extremamente baixo, resultante da presença de ácido acético. Todavia, verifica-se que a atividade antifúngica e antibacteriana destes produtos acetificados está condicionada por vários fatores, nomeadamente a estirpe microbiana, a temperatura, o pH, a concentração de ácido acético e a força iónica (Samad *et al.*, 2016).

No estudo de Hammouda et al (2021) a atividade antimicrobiana de vinagres foi testada contra estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como contra espécies de fungos, revelando os resultados que, a maioria das amostras de vinagre foram consideradas mais inibidoras contra as estirpes de bactérias do que contra os fungos.

Neste contexto e de forma generalizada, esses resultados indicaram o alto potencial dos vinagres tradicionais de frutas da Tunísia, como agentes antioxidantes e antimicrobianos, podendo ser usados como ingredientes alimentares funcionais.

Já no que se refere ao ácido acético, sendo este o ácido orgânico que predomina no vinagre, constata-se que o mesmo causa a inibição celular microbiana quando se difunde através das membranas celulares dos microrganismos. Aliás, vários investigadores demonstraram que os vinagres inibem efetivamente o crescimento de microrganismos, incluindo *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Micrococcus catarrhalis* e *Diplococcus pneumonia* (Sengun *et al.*, 2020). Por esta razão, os produtos acetificados como o vinagre, podem ser usados comumente para desinfecção de equipamentos e superfícies de preparação de alimentos, e preservação de alimentos, observando-se igualmente que, os microrganismos patogênicos também são eliminados com sucesso dos vegetais após lavagem ou imersão dos mesmos, em vinagre (Sengun *et al.*, 2020).

Sem alterar o sabor, a textura e o teor de nutrientes, as soluções de ácido acético e os vinagres têm sido usados, de modo a proteger alguns produtos, como a carne e os vegetais (pe. a alface) contra *E. coli*, *S. Typhimurium* e *Listeria monocytogenes* (Samad *et al.*, 2016). A pós-colheita da matéria prima é um dos processos mais importantes na linha de produção para garantir a qualidade do produto e a aceitação dos consumidores.

No estudo de Desai *et al.* (2014) o objetivo principal consistia em determinar a eficácia antimicrobiana do vinagre na inibição do crescimento de microrganismos mesófilos e bactérias ácido-lácticas de modo a que se aumentasse o tempo de prateleira de amostras de carne de frango, refrigeradas, em embalagens com atmosfera modificada (CO<sub>2</sub>). As amostras de controlo e as amostras tratadas com vinagre (0,5%; 1,0%) foram analisadas após 0, 4, 8, 12, 16 e 20 dias de armazenamento refrigerado. As contagens de microrganismos mesófilos e de bactérias ácido-lácticas (BAL) não apresentaram diferenças significativas após 0 e 4 dias de armazenamento, porém a carga bacteriana mesófila foi menor no tratamento com vinagre a 1,0% após 8, 12, 16 e 20 dias de armazenamento. As amostras de controlo aos 12 dias de armazenamento já se apresentavam numa fase de deterioração e no dia 16 tinham um aroma muito alterado, enquanto que as amostras com o tratamento com vinagre a 1,0% não apresentavam um estado de deterioração no dia 20, como evidenciado nas amostras de controlo. Para as

BAL, o tratamento com vinagre a 1,0% teve contagens mais baixas do que as amostras de controlo nos dias 12 e 16. O tratamento com vinagre a 0,5% teve contagens bacterianas mais baixas no dia 12 em relação às amostras de controlo, o que permitirá uma vida útil de prateleira de aproximadamente 16 dias.

As características bioativas (bioatividades), nomeadamente o potencial antioxidante e antimicrobiano dos produtos acetificados como o vinagre, podem derivar do uso na sua produção, de uma grande variedade de frutas e vegetais, fonte de compostos fenólicos e ácidos orgânicos (Bakir *et al.*, 2017).

## **1.5 Matérias Primas**

Atualmente, existem vários tipos de vinagre produzidos globalmente e a maioria deles é produzida a partir de matérias-primas baratas, podendo incluir subprodutos obtidos do processamento de alimentos, frutas de baixa qualidade, excedentes agrícolas e desperdício de frutas (Hutchinson *et al.*, 2019), verificando-se que os vinagres obtidos de frutos ou de malte possuem composição mais complexa que o vinagre de vinho, pois contêm praticamente todas as substâncias solúveis existentes na matéria-prima, ou que se formaram nos processos fermentativos alcoólicos e acético.

O vinagre tradicional é produzido a partir de matérias-primas que contenham açúcar ou amido, desenvolvendo-se este processo em duas fases de fermentação em que na primeira é produzido etanol e, posteriormente ácido acético (Teskaye *et al.*, 2002). Contudo, os vinagres de frutas são considerados superiores em qualidades sensoriais e nutricionais, quando comparados a outros tipos de vinagre (Marques *et al.*, 2010).

Os vinagres tradicionais produzidos a partir de sumos de frutas como uva, maçã ou ameixa, normalmente, resultam de fermentações longas, que duram um mês ou mais, usando o vinagre obtido de uma acetificação anterior como cultura inicial (mãe do vinagre). Já o vinagre industrial pode ser fabricado, aproximadamente, num dia (Budak *et al.*, 2014).

### **1.5.1 Frutos Fermentados**

A fruta representa uma das principais fontes de nutrientes com propriedades funcionais, sendo uma fonte de fitoquímicos com atividade antioxidante, e também sabores, cores e aromas. Os antioxidantes presentes nas frutas são associados aos seus benefícios nutricionais, devido à sua capacidade de eliminar e inibir os radicais livres formados durante o metabolismo oxidativo com efeitos prejudiciais para saúde humana (Coelho *et al.*, 2017).

Muitos ácidos orgânicos são encontrados, de forma natural, em diversas frutas e alimentos fermentados, como por exemplo, os ácidos acético, láctico, ascórbico, cítrico, málico, succínico e tartárico e, em níveis não excessivos, nenhum desses ácidos é perigoso para a saúde humana (Budak *et al.*, 2014).

Todas as frutas e vegetais contêm água, açúcares, vitaminas, polissacarídeos, minerais e proteínas em quantidades mínimas, contudo, através de processos fermentativos, os açúcares podem ser adicionados, de modo a aumentar o teor de ácido final (Shah e Singhal, 2017).

A fermentação produz ácidos, ésteres, álcoois, vitaminas, entre outros, ocorrendo em simultâneo, a degradação de fatores anti nutricionais e tóxicos, caso existam. (Shah e Singhal, 2017).

No que se refere à microbiota, verifica-se que esta se desenvolve utilizando os açúcares e algumas proteínas assim como outros nutrientes presentes na matéria-prima (Shah e Singhal, 2017).

### **1.6 Microrganismos Envolvidos no Processamento do Vinagre**

As bactérias acéticas, as ácido-lácticas e as leveduras desempenham um papel fundamental na produção de produtos acetificados como o vinagre e têm uma influência na sua qualidade (Hammouda *et al.*, 2021).

### 1.6.1 Bactérias Acéticas

As bactérias acéticas (BA) integram um grupo da família *Acetobacteriaceae* e são aeróbias obrigatórias, Gram-negativas ou Gram-variáveis, não formadoras de esporos e apresentam-se sob de forma de bastonetes elipsoidais. Possuem catalases e oxidases. Apresentam um crescimento ótimo no intervalo de temperatura compreendido entre os 25 ° e 30 °C e o pH ótimo para o seu crescimento situa-se entre os 5 e os 6.5 (Budak *et al.*, 2014). As principais espécies responsáveis pela produção do vinagre pertencem aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* e *Komagataeibacter* devido à sua alta capacidade de oxidar o etanol em ácido acético e alta resistência ao ácido acético libertado no meio fermentativo. Estas bactérias têm uma capacidade de produzir polímeros extracelulares, por exemplo, a celulose bacteriana, que é principalmente sintetizada por espécies dos gêneros *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*. Este polímero é altamente versátil, com propriedades únicas nomeadamente, alta capacidade de retenção de água, estrutura de rede ultrafina, biocompatibilidade, alta cristalinidade, características que conduzem a uma variedade de aplicações comerciais. O género *Acetobacter* foi classificado com base na presença/ausência de flagelos peritrícos e na capacidade de oxidar acetato e lactato. O género *Gluconobacter* foi classificado com base na presença/ausência de flagelos polares, incapacidade de oxidar acetato e lactato e a capacidade de oxidar d-glicose em gluconato, e depois de oxidar o gluconato em 2-cetogluconato e 5-cetogluconato (Gomes *et al.*, 2018).

As espécies das bactérias acéticas são conhecidas por terem uma elevada capacidade de oxidar álcoois, aldeídos e açúcares na presença de oxigénio. Como resultado dessas atividades oxidativas, os produtos de oxidação correspondentes, tais como ácidos carboxílicos, acumulam-se no meio de cultura. Essas reações oxidativas são catalisadas por desidrogenases primárias que se localizam na superfície externa da membrana citoplasmática. Muitas outras espécies bacterianas também são capazes de oxidar o etanol sob condições aeróbicas, no entanto são incapazes de o fazer em condições altamente ácidas. O ácido acético produzido é libertado no meio de crescimento, onde se acumula até um máximo de 5 a 10% nas espécies de *Acetobacter* e de 10 a 20% nas espécies de *Komagataeibacter*. Alguns gêneros podem oxidar ainda mais o ácido acético em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (superoxidação), sendo esta habilidade útil para a distinção do género

*Gluconobacter*, que não possui esta capacidade. Esta condição depende da composição do meio, especialmente quando o etanol é usado pelas bactérias (Gomes *et al.*, 2018).

Na última década, com base em análises genéticas e características fenotípicas foi proposto um novo gênero, *Komagataeibacter* que compreende espécies que pertenciam ao gênero *Glucanoacetobacter*. Estes dois gêneros diferenciam-se um do outro pela produção de um pigmento castanho solúvel em água e pela motilidade celular. As espécies de *Gluconacetobacter* geralmente, produzem um pigmento castanho solúvel em água e são móveis, enquanto que as espécies de *Komagataeibacter* não produzem o pigmento e são imóveis. As espécies do gênero *Gluconacetobacter* estão associadas a plantas e isoladas principalmente de frutas, flores, café e cana-de-açúcar e, por outro lado, as espécies do gênero *Komagataeibacter* têm sido isoladas principalmente de vários substratos que contêm açúcar e etanol, como alimentos fermentados- vinagre, kombucha, nata de coco e sumo de frutas (Gomes *et al.*, 2018).

Durante a acetificação, as espécies das bactérias acéticas surgem dependendo da concentração de ácido acético. Na primeira etapa de acidificação - baixa concentração de ácido acético - há predomínio do gênero *Acetobacter*. Posteriormente, quando a proporção de massa por volume de ácido acético excede 5%, a população de espécies do gênero *Komagataeibacter* é a que domina. Portanto, as espécies incluídas no gênero *Komagataeibacter* são as principais estirpes envolvidas na fermentação submersa de ácido acético para produzir vinagre. As espécies *K. europaeus*, *K. intermedius* e *K. oboediens* são representantes típicas durante a produção natural de vinagre com acidez acima de 6%, e *K. europaeus* é descrita como uma das BA mais frequentemente encontradas e isoladas em fermentadores de vinagre submersos. Este comportamento resulta de uma maior resistência desses microrganismos às maiores concentrações de ácido acético e sua maior adaptação à acidez extrema. Em contraste, espécies dos gêneros *Acetobacter* são as principais responsáveis pela produção de superfície tradicional de vinagre, em que o teor final de ácido acético não ultrapassa 8%, sendo este considerado o limite de ácido acético para essas bactérias. Além dos métodos de fermentação e da concentração de ácido acético, as espécies de BA presentes no meio de fermentação também são significativamente afetadas pelas matérias-primas utilizadas na produção do vinagre (Gomes *et al.*, 2018).

As principais propriedades dos gêneros das bactérias acéticas associadas à produção de vinagre são apresentadas na tabela 1.6.

Tabela 1.6 - Principais propriedades dos géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* e *Komagataeibacter*. Adaptado de Gomes *et al.* (2018)

<b>Caraterística</b>	<b><i>Acetobacter</i></b>	<b><i>Gluconobacter</i></b>	<b><i>Gluconacetobacter</i></b>	<b><i>Komagataeibacter</i></b>
Motilidade e flagelação	Perítrico ou não-móvel	Polar ou não-móvel	Perítrico ou não-móvel	Não tem
Oxidação do etanol em ácido acético	+	+	+	+
Oxidação do ácido acético em CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O	+	-	+	+
Oxidação do lactato em CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O	+	-	+	+
Crescimento em 0,35% ácido acético	+	+	+	+
Crescimento na presença de 30% D-glicose	-	+ ou -	+ ou -	n.d.
Produção de celulose	-	-	+ ou -	+ ou -
Produção de dihidroxiacetona a partir de glicerol	+ ou -	+	+ ou -	+ ou -
Produção de ácido a partir de:				
Glicerol	+ ou -	+	+	n.d.
D-Manitol	+ ou -	+	+ ou -	-
Rafinose	-	-	-	n.d.
Produção de pigmento castanho solúvel em água	-	Variável	Variável	-
Produção de D-glicose a partir de:				
2-keto-D-gluconato	+ ou -	+	+ ou -	+ ou -
5-keto-D-gluconato	+ ou -	+ ou -	+ ou -	+ ou -
2,5-diketo-D-gluconato	+ ou -	+ ou -	+ ou -	-
Principal ubiquinona	Q9	Q10	Q10	Q10

Legenda: + = 90% ou mais das estirpes positivas; - = 90% ou mais das estirpes negativas; n.d. = não determinado.

### 1.6.2 Bactérias Ácido-Láticas

As bactérias ácido-láticas (BAL) são os principais microrganismos responsáveis pela fermentação ácida de frutas e legumes (Shah e Singhal, 2017). São anaeróbias facultativas, não formam esporos e têm complexos requisitos nutricionais. Para o seu crescimento, requerem um meio que contenha todos os aminoácidos e muitas vitaminas, que não sejam capazes de sintetizar. São Gram-positivas e não possuem catalases, com exceção de um número de espécies do género *Pediococcus*. Algumas espécies das BAL são mesofílicas e outras termofílicas, sendo que estas últimas apresentam uma temperatura ótima de crescimento acima dos 40 °C. Apresentam crescimento num pH de 7, contudo também conseguem crescer em habitats com valores de pH muito baixos. Algumas espécies, homo ou heterofermentativas, podem crescer em valores de pH compreendidos entre 3 e 4, verificando-se, não obstante, que apresentam capacidade de produzir ácidos com valores de pH mais baixo que o do próprio substrato de crescimento (Solieri e Giudici, 2009). Com base nas suas necessidades de carbono e de energia, a BAL são classificadas como heterotróficas e quimiorganotróficas, o que significa que requerem carbono orgânico pré formado como fonte de energia (Hutkins, 2018).

São amplamente usadas no processo de fermentação de bebidas alcoólicas conseguindo crescer antes e depois do processo de fermentação. Em algumas situações são usadas como culturas “starter”, contudo noutros casos o seu crescimento é considerado prejudicial. Algumas BAL podem ser usadas para, no caso da cerveja, diminuir o pH do mosto garantido estabilidade biológica ao produto final, sendo que no caso do vinho, as mesmas podem ser benéficas na redução da acidez total. Contudo, o crescimento das BAL na cerveja, após fermentação do mosto e no produto final, é considerado prejudicial, já que potencia a turvação do produto e aumenta os níveis de acidez de forma excessiva. Na produção de vinagre, o crescimento das BAL não afeta o desempenho das bactérias acéticas (Solieri e Giudici, 2009).

### 1.6.3 Leveduras

As leveduras pertencem ao reino Fungi, e dependendo do seu modo de reprodução, são distribuídas fundamentalmente pelos grupos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, e *Zygomycota*, sendo que, para a produção de vinagre, o filo que inclui o maior número de espécies de interesse é o *Ascomycota*. São organismos mesofílicos, que apresentam como temperatura ótima de crescimento o intervalo compreendido entre os 20 ° e 40 °C. Algumas conseguem crescer abaixo dos 20 °C, tornando-as microrganismos psicotróficos ou psicofílicos. Todavia, algumas espécies de levedura podem crescer e ser metabolicamente ativas em temperaturas extremas, como é o caso de algumas espécies do género *Kluyveromyces*, que mantêm a capacidade de reprodução e fermentação a temperaturas acima dos 40 °C. Já algumas espécies do género *Saccharomyces* apresentam uma temperatura mínima muito baixa para o seu crescimento e podem fermentar a aproximadamente 0 °C. Algumas espécies do género *Zygosaccharomyces* são tolerantes a altas temperaturas e podem sobreviver a temperaturas que são letais para as células e para os esporos de todos os outros géneros. O género *Zygosaccharomyces* inclui espécies envolvidas na degradação de alimentos muito tolerantes em ambientes ácidos (Solieri e Giudici, 2009).

As leveduras apresentam um bom crescimento num pH compreendido entre 3 e 5, demonstrando dificuldades em pH neutro, sendo que os compostos essenciais ao seu crescimento são o carbono, nitrogénio, vitaminas, minerais e outros elementos como o fósforo, enxofre, potássio e magnésio, ainda que em menores quantidades (Solieri e Giudici, 2009).

Tratam-se de microrganismos com metabolismo respiratório que conseguem crescer na presença de oxigénio, usando uma grande variedade de compostos de carbono. Por outro lado, na ausência de oxigénio, várias espécies de leveduras apresentam um metabolismo fermentativo, especialmente quando metabolizam monossacáridos (Solieri e Giudici, 2009).

## 1.7 Fermentação Alcoólica e Acetificação

O processamento de produtos acetificados inicia-se por uma fermentação alcoólica, que ocorre na ausência de oxigénio, em que os açúcares simples (mono e dissacáridos) das matérias-primas são convertidos em etanol por leveduras, como por exemplo *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo-se um fermentado alcoólico. Nesta fase de fermentação anaeróbia, de acordo com Li *et al.*, (2015) deve ser mantida uma temperatura controlada de 20-30 °C.

A fermentação alcoólica para obter vinagres de frutas pode ocorrer em resultado de fermentações naturais realizadas por leveduras naturalmente presentes nos frutos, nos equipamentos ou no ambiente, ou resultar da inoculação de culturas puras (“starters”) do género *Saccharomyces*. Nas produções artesanais, esta fermentação ocorre sempre naturalmente, mas nas produções industriais em grande escala é realizada adicionando-se uma cultura inicial, principalmente do género *Saccharomyces* e da espécie *S. cerevisiae* (Li *et al.*, 2015). Após a etapa de fermentação alcoólica, as leveduras ficam inativas e começam a autolisar-se (Solieri e Giudici, 2009).

A fermentação alcoólica é um processo, em que há degradação de moléculas de açúcar, no interior das células de microrganismos (leveduras), com produção de etanol e dióxido de carbono (Figura 1.1) (Henriques, 2014). Os açúcares são convertidos nos monossacáridos glicose e frutose. Posteriormente, a glicose e a frutose são convertidas em piruvato durante a glicólise, e o piruvato é convertido em etanol e CO<sub>2</sub>. Numa primeira etapa, o piruvato é descarboxilado e forma-se o acetaldeído. Na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol. A fermentação também produz biomassa celular e outros produtos como glicerol e ácidos orgânicos (Rodrigues *et al.*, 2018).

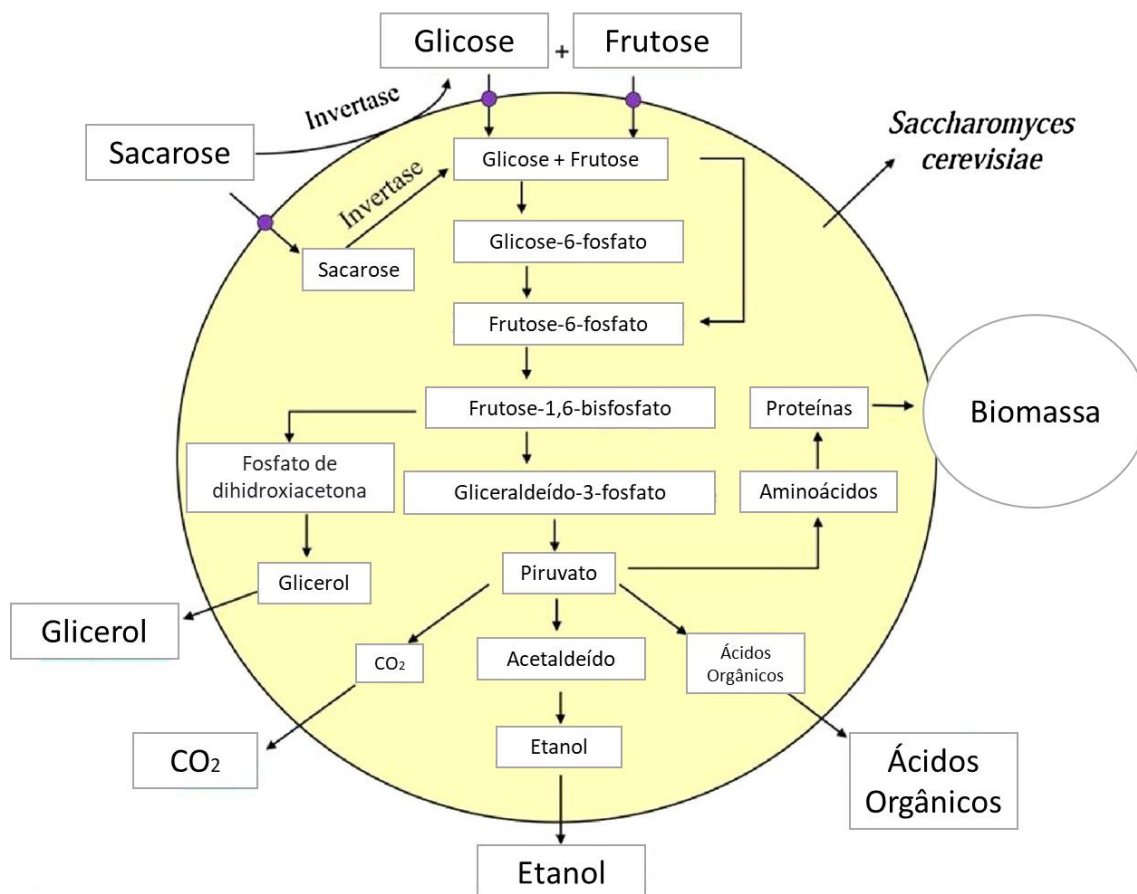


Figura 1.1 - Esquema da via metabólica da fermentação alcoólica. Adaptado de Rodrigues *et al.* (2018)

A via do ácido acético é fundamentalmente levada a cabo por bactérias dos géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter* e outras bactérias acéticas, sendo um exemplo de uma oxidação incompleta. Na maioria das vias oxidativas, como por exemplo, o ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico), os substratos orgânicos são normalmente oxidados a dióxido de carbono e a água. No entanto, na acetificação, as bactérias do ácido acético geralmente oxidam o substrato - etanol, apenas em ácido acético. Existem, exceções onde pode ocorrer a oxidação completa com obtenção de dióxido de carbono (Hutkins, 2018).

A acetificação é realizada em duas etapas principais, que consistem na oxidação do etanol em acetaldeído, e depois na oxidação do acetaldeído em ácido acético. Verifica-se ainda, a existência de uma etapa intermédia em que o hidrato de acetaldeído é formado, sendo o oxigénio essencial como recetor de eletrões. A conversão de etanol em ácido acético ocorre de modo a que após a conclusão das reações, a concentração de ácido acético seja

igual à do etanol do produto inicial. A via do ácido acético produz energia, mas não por fosforilação ao nível do substrato. Neste caso, as reações de oxidação estão ligadas à cadeia respiratória que gera ATP através da cadeia de transporte de elétrons e das reações de fosforilação oxidativa. A produção do ácido acético decorre fundamentalmente no periplasma das bactérias já que tanto o substrato (etanol) quanto o produto (ácido acético) são tóxicos para as células, quando em concentrações acima de certos valores (Figura 1.2) (Hutkins, 2018).

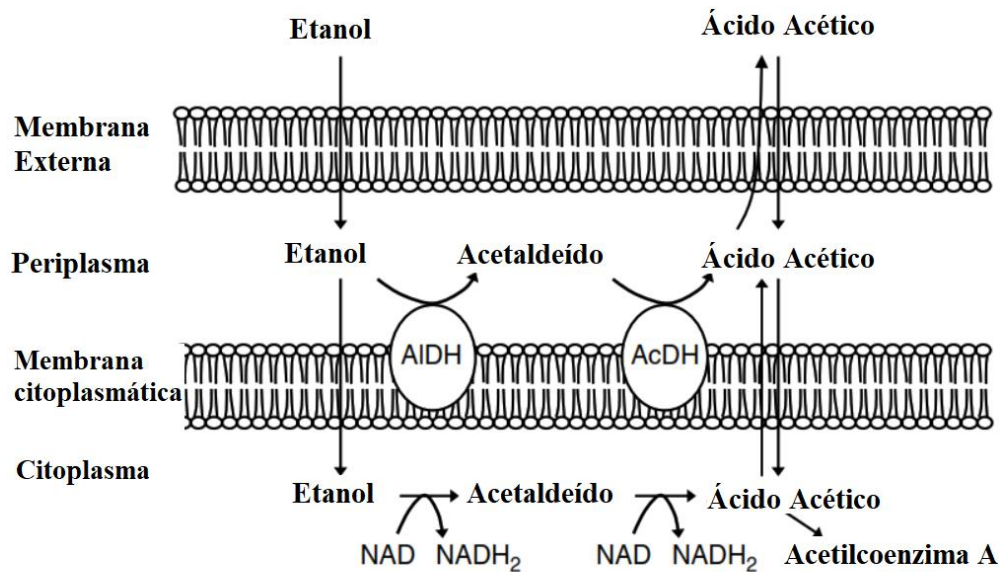


Figura 1.2 - Reações de oxidação em membrana biológica. Adaptado de Hutkins (2018)

A figura 1.3 traduz as etapas da produção do vinagre, que decorrem em dois processos de fermentação - alcoólica e acética.

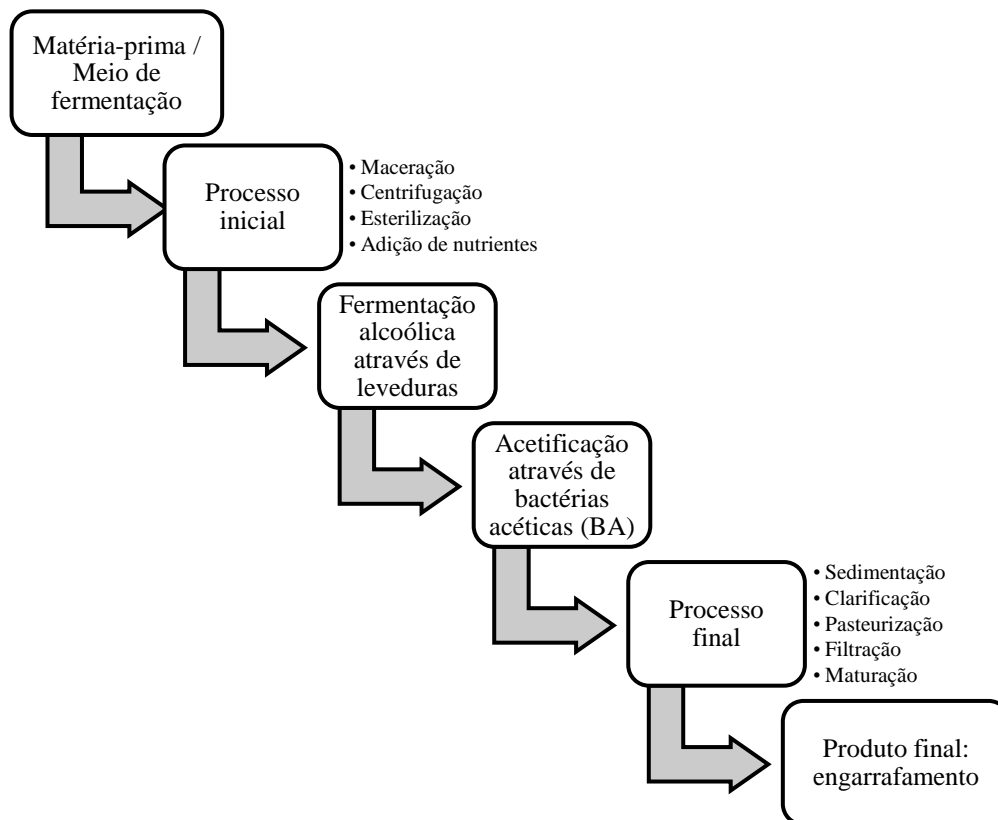


Figura 1.3 - Ilustração das etapas envolvidas na produção de vinagre. Adaptado de Hutchinson *et al.* (2019)

## 1.8 Processos de Acetificação

A acetificação com vista à obtenção de vinagre pode realizar-se por três processos tecnológicos: o método lento (de Orleans), o método rápido (de Schutzenbach) e o método de acetificação submersa (de Frings).

O sucesso da acetificação e a qualidade do vinagre obtido dependem de vários fatores, tais como a matéria-prima e o seu teor alcoólico, o pH, a temperatura, a disponibilidade de oxigénio e a natureza das bactérias acéticas (Suman, 2012).

O teor alcoólico do substrato a acetificar afeta o crescimento das bactérias acéticas e a qualidade do vinagre, uma vez que concentrações acima de 13% de álcool dificultam a acetificação, pois nestas condições o álcool não é completamente oxidado (Suman, 2012). Outro fator muito importante na acetificação é a disponibilidade em oxigénio, pois as bactérias produtoras de ácido acético são aeróbias obrigatórias. A capacidade de as bactérias acéticas produzirem ácido acético é limitada principalmente pela disponibilidade e transporte do oxigénio da atmosfera para a superfície das células

bacterianas. O aumento da taxa de oxidação do etanol nos processos tecnológicos depende muito da área de contacto do ar com as bactérias acéticas e com o líquido a acetificar, a qual deve ser maximizada (Hutkins, 2018).

### 1.8.1 Apreciação Comparativa dos Diferentes Processos Tecnológicos

Os três processos básicos de produção de vinagre podem oferecer produtos de ótima qualidade, desde que os requisitos básicos de cada processo sejam rigorosamente observados. As diferenças entre si são enormes, nomeadamente em relação a fatores como o custo do equipamento, produtividade, facilidade operacional, entre outros. A tabela 1.7 compara as principais diferenças entre os três processos (Aquarone *et al.*, 2001).

Tabela 1.7 - Comparação entre processos de acetificação. Adaptado de Aquarone *et al.* (2001)

	<b>Lento</b>	<b>Rápido</b>	<b>Submerso</b>
<b>Qualidade do vinagre</b>	Ótima	Depende do envelhecimento	Depende de clarificação e envelhecimento
<b>Custo do equipamento</b>	Baixo	Alto	Alto
<b>Rendimento do processo</b>	Variável	Variável	Alto
<b>Produtividade</b>	Baixa	Variável	Alta
<b>Facilidade operacional</b>	Grande	Média	Grande
<b>Manutenção do equipamento</b>	Simples	Trabalhosa	Simples
<b>Volume de produção</b>	Pequeno	Médio	Grande

### 1.8.2 Método Lento (de Orleans)

O método clássico de Orleans é um dos processos mais antigos de produção de vinagre. Conhecido e utilizado desde a antiguidade, o seu aprimoramento tecnológico teve início há cerca de 200 anos, após a observação de que quando os barris que continham vinho não estavam cheios, apresentavam um “avinagramento” mais rápido pelo facto de existir uma maior superfície em contacto com o ar. A partir daí, surgiram técnicas para facilitar o arejamento, tais como, a promoção de aberturas laterais nos recipientes para passagem

de ar, a manutenção do barril em posição horizontal e a utilização de volumes de substrato alcoólico a acetificar (vinho ou outros) menores (Suman, 2012).

Este processo é realizado em recipientes (barris) de acetificação aos quais se adiciona o substrato alcoólico num volume de 60-70% da sua capacidade, sendo o inóculo uma cultura de vinagre produzido recentemente, contendo uma película localizada na interface líquido-ar designada “mãe do vinagre” onde estão as bactérias acéticas. A acetificação é lenta, ocorrendo preferencialmente junto à superfície do líquido, onde existe oxigénio suficiente que garanta a conversão do álcool em ácido acético. Porém, como a disponibilidade de oxigénio é reduzida, este processo é realizado em barris ou recipientes com aberturas (orifícios), que permitem o contato do ar com a superfície do líquido (Figura 1.4) (Hutkins, 2018).

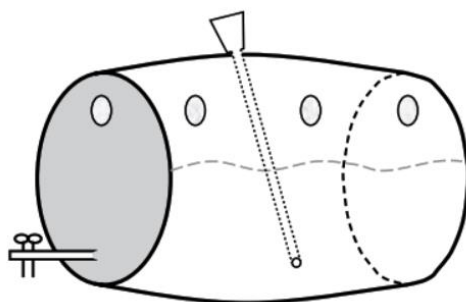


Figura 1.4 - Ilustração esquemática do barril usado no método de Orleans. Adaptado de Hutkins (2018).

A temperatura a que este processo deve ocorrer não deve exceder os 25 °C, evitando-se assim perdas de álcool por evaporação. Todos os orifícios do barril devem ser protegidos com gaze para evitar a presença de insetos que são atraídos pelos odores dos substratos e dos produtos da acetificação (Suman, 2012). Na extremidade inferior do recipiente posiciona-se uma torneira para retirar o produto final. Quando concluída a produção do ácido acético, é possível retirar uma parte (de um terço a dois terços) do vinagre obtido e adicionar um volume da matéria-prima desejada, através de um dispositivo de enchimento posicionado na parte superior do barril até à parte inferior interna, de forma a que a produção de ácido acético prossiga sem interromper o processo (processo semi-contínuo), evitando destruir a “mãe do vinagre” (Figura 1.5) (Ho *et al.*, 2017).

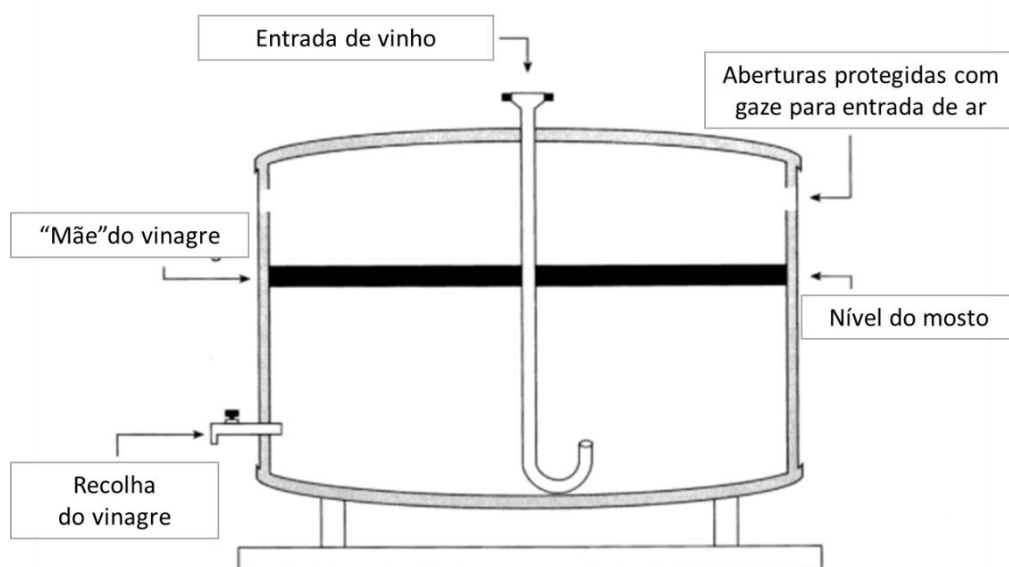


Figura 1.5 - Ilustração de corte transversal de barril frequentemente utilizado para a produção de vinagre pelo método de Orleans. Adaptado de Aquarone *et al.* (2001)

Cada ciclo de acetificação completo pode demorar entre duas a três semanas, ou mais, dependendo da temperatura, da taxa de troca de ar (Hutkins, 2018), assim como da composição inicial da solução alcoólica, a natureza dos microrganismos, contacto da superfície líquido/ ar, entre outros. Após o ciclo completo da acetificação, retira-se do recipiente 60 a 70% do volume original, o qual é substituído por matéria prima, sendo o processo de acetificação repetido (Dabija e Hatnean, 2014).

Neste processo o vinagre é produzido de maneira “estática” e as bactérias acéticas tendem a acumular-se na superfície do líquido a acetificar, dando origem a uma película gelatinosa, constituída por exopolissacáridos sintetizados pelas bactérias acéticas (mãe do vinagre). Por esse motivo, este processo também é chamado de método de superfície, contrariamente aos métodos submersos, onde as bactérias são dispersas no líquido de fermentação (Argyro Bekatorou, 2019; Mohammad Rahman, 2020). A perturbação dessa película leva ao seu rompimento e, conseqüente, imersão. As bactérias submersas podem sobreviver utilizando os nutrientes disponíveis, porém e devido à carência de oxigênio, deixam de produzir ácido acético (Suman, 2012).

No que diz respeito ao produto final, a qualidade do vinagre produzido pelo método de Orleans é considerada muito superior à dos vinagres produzidos pelos métodos mais rápidos (Ho *et al.*, 2017).

Os vinagres estudados no presente trabalho foram produzidos pelo método de Orleans.

### **1.8.3 Método Rápido (de Schutzenbach)**

O método rápido de obtenção de vinagre é realizado em acetificadores ou geradores de gotejamento. Este método foi designado de método rápido por oposição ao método disponível anteriormente, o método clássico de Orleans, em que a produção de vinagre ocorria em barris e demorava várias semanas. Os primeiros exemplos de geradores de gotejamento usados industrialmente foram desenvolvidos por Schutzenbach e Ham em 1823 e 1824, respetivamente. Nestes sistemas, que ainda são amplamente usados, os substratos etanólicos são circulados ou gotejados para tanques de acetificação cilíndricos ou tonéis contendo materiais inertes, como aparas de madeira ou espigas de milho que permitem aumentar bastante a área de interface entre o ar e o líquido a acetificar. No entanto, podem ser usados outros materiais de boa qualidade, que possuam uma área superficial grande, desde que não alterem o sabor do produto final (Hutkins, 2018).

Os acetificadores ou geradores de gotejamento são equipamentos com três secções - a secção superior onde a matéria-prima ou o substrato alcoólico é introduzido, a secção média constituída por materiais inertes com uma área superficial grande (pe. aparas de madeira) que servem de suporte às bactérias acéticas, e, a secção inferior, onde o vinagre é recolhido num reservatório. O ar entra no sistema através de aberturas laterais, a matéria-prima ou o substrato alcoólico desce por gravidade entrando em contacto com as bactérias imobilizadas na secção média do recipiente, sendo que ao longo desse percurso, parte do etanol da solução introduzida é convertido em ácido acético. O líquido ao chegar à parte inferior do tanque é re-circulado para a parte superior até todo o etanol ter sido convertido em ácido acético (figura 1.6) (Ho *et al.*, 2017).

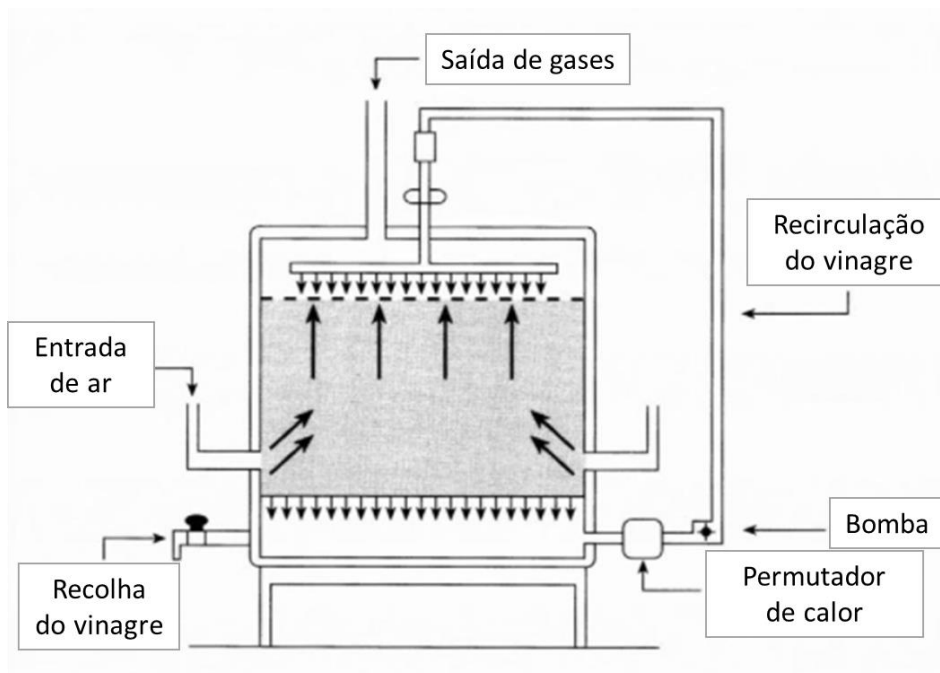


Figura 1.6 - Ilustração de gerador utilizado no processo rápido para a produção de vinagre Adaptado de Aquarone *et al.* (2001)

O processo demora aproximadamente 3-7 dias para completar a produção do vinagre. Dois terços do produto final de vinagre são retirados do tanque e uma nova matéria-prima é adicionada lentamente na parte superior do acetificador. A temperatura ótima para este método é de 30 °C (Ho *et al.*, 2017).

#### 1.8.4 Método de Acetificação Submersa (de Frings)

O método de acetificação submersa decorre num reator com uma fase líquida, o substrato alcoólico, com uma determinada composição em etanol, onde se encontram dispersas as bactérias acéticas e as bolhas de ar, de uma forma homogénea. Este processo é baseado na tecnologia desenvolvida, nos anos 40, por uma empresa alemã. Os equipamentos utilizados na acetificação submersa consistem em tanques de fermentação de aço inoxidável com uma capacidade de 10,000 L a 40,000 L, munidos com vários dispositivos que permitem a monitorização e automatização de algumas operações, tais como: a) um sistema de fornecimento de ar (compressor), b) um sistema de arrefecimento (serpentina), c) um sistema de controlo de espuma, e d) válvulas de carga e descarga, entre outros (Figura 1.7) (Ho *et al.*, 2017).

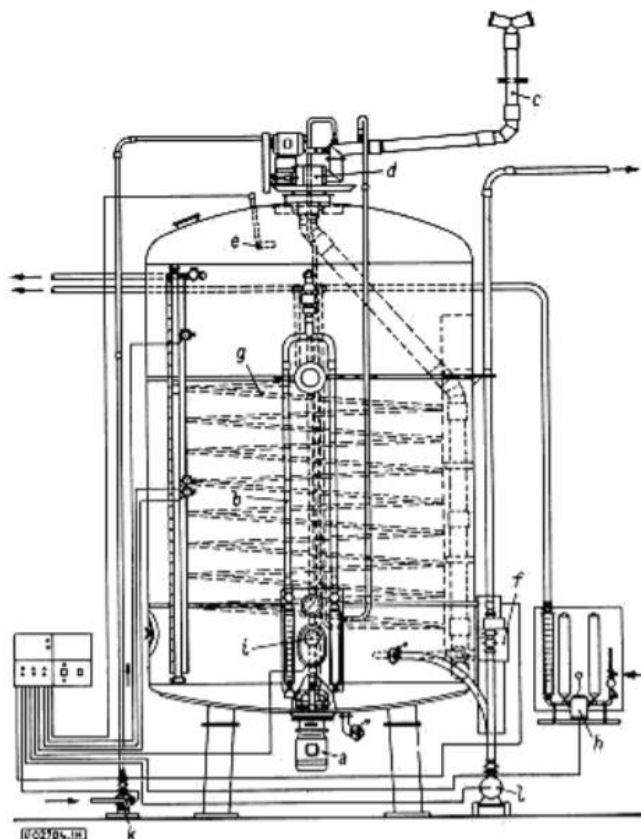


Figura 1.7 - Ilustração de um acetificador para a produção de vinagre pelo método de acetificação submersa: a) turbina de ar; b) compensador de ar; c) dispositivo para coletar líquido de condensação; d-e) dispositivo para controlar a formação de espuma; f) dispositivo para medir o álcool; g) serpentina para refrigeração; h) dispositivo para refrigeração; i) termómetro; j) bomba para entrada do vinho; k) bomba para retirada do vinagre. Adaptado de Veloso (2013)

As três principais etapas deste processo são a introdução de matérias-primas e inóculos no reator, a acetificação e o descarregamento completo do produto acetificado. Parte do produto acetificado é descarregado, e a outra parte, cerca de 10 - 20%, é deixada no reator, constituindo o inóculo para o ciclo de acetificação seguinte (Ho *et al.*, 2017).

O arejamento deve ser controlado cuidadosamente, pois um decréscimo da pressão parcial de oxigênio altera o metabolismo bacteriano e condiciona a acetificação. Um disco giratório no espaço livre do tanque de reação evita a formação de espuma excessiva. O processo de acetificação é exotérmico e assim, o sistema deve permitir, através de uma serpentina, a dissipação térmica, possibilitando, dessa forma, o controlo da temperatura dentro de uma faixa conveniente. A temperatura ótima da acetificação depende da concentração do substrato, no entanto deve ser cerca de 28 °C (Suman, 2012). Neste processo, o substrato alcoólico pode ser acetificado trinta vezes mais rapidamente do que

em qualquer dos outros processos, devendo o ar ser controlado cuidadosamente, pois um decréscimo da pressão parcial do oxigénio altera o metabolismo bacteriano (Henriques, 2014).

## **1.9 Operações de Acabamento**

Após a acetificação, o vinagre produzido não deve permanecer no recipiente onde decorreu a sua produção, pois se isto acontecer, as bactérias, não tendo mais álcool para metabolizar, podem começar a oxidar o ácido acético e, conseqüentemente, o vinagre vai perdendo as suas características químicas e organolépticas (Tsfaye *et al.*, 2002). Sendo assim, o vinagre deve ser acondicionado em recipientes apropriados e estes devem ser mantidos num local sem contato com o ar, pois sem oxigénio as bactérias são inibidas (Suman, 2012).

As etapas pós-acetificação podem incluir as seguintes operações: filtração, clarificação, diluição, aromatização, estabilização, envelhecimento, pasteurização e o engarrafamento.

A filtração tem como objetivos recolher e reservar a “mãe do vinagre”, bem como remover as possíveis partículas em suspensão. O tipo de filtração geralmente utilizado é uma microfiltração com membranas tangenciais com um diâmetro de poro muito reduzido ( $\mu\text{m}$ ), permitindo assim a retenção das partículas mais pequenas (Prodanov *et al.*, 2019).

Segue-se uma diluição com água até à concentração desejada e posterior engarrafamento, obtendo-se assim o vinagre acabado. A diluição do vinagre é uma etapa muito importante para os fabricantes de vinagre, uma vez que um erro nesta etapa, decorrente do não cumprimento das especificações legais do produto, pode representar uma elevada perda económica/ problemas.

O engarrafamento dos vinagres pode ser realizado em garrafas de vidro, policloreto de vinilo (PVC) ou de polietileno tereftalato (PET), fechadas com tampas plásticas. Após o engarrafamento é feita uma pasteurização a uma temperatura de 60 a 66 °C, durante 30 minutos, em alternativa, uma pasteurização contínua e posterior embalagem (Cruz, 2012). A grande desvantagem do material PET é a sua permeabilidade aos gases que, embora pequena, existe, ao contrário do vidro que não apresenta permeabilidade aos gases. Depois da acetificação, o perigo de deterioração é muito baixo, uma vez que o ácido

acético tem uma forte atividade antibacteriana e um pH baixo (Makhdoumi *et al.*, 2021; Costa, 2014).

Com o passar do tempo as características do vinagre, como o odor e o sabor tornam-se mais suaves e agradáveis, devido às reações que ocorrem durante o processo de envelhecimento, porém este processo é complexo, acarretando uma série de reações químicas e alterações físicas, como oxidação, esterificação e condensação (Wang *et al.*, 2017). As reações de esterificação retiram ácidos e álcoois do meio, fornecendo ésteres aromáticos, proporcionando aromas agradáveis, e a reação de oxidação é a que confere aspereza ao vinagre. Os vinagres de vinhos de frutas necessitam de alguns meses de envelhecimento enquanto que os vinagres de vinho, apenas requerem algumas semanas (Suman, 2012).

Dependendo da maneira como ocorre a acetificação, o vinagre pode ser relativamente claro (sem partículas em suspensão), se o produto for envelhecido em barris, ou muito turvo, se a acetificação ocorreu pelo método submerso. Já o vinagre obtido pelo método Orleans ou após envelhecimento e a posterior transferência para barris, não exige filtração (Suman, 2012). No caso de acetificações submersas, a remoção de células suspensas no vinagre geralmente requer tratamentos de filtração mais elaborados, bem como, os vinagres produzidos através do método rápido.

Muitas vezes são utilizados tratamentos térmicos nos vinagres, como a pasteurização, que permite evitar a sua contaminação (bactérias do ácido acético, bactérias do ácido láctico, leveduras e fungos) e manter as suas características físico-químicas e organolépticas durante o período de comercialização (Hutkins, 2018). A pasteurização consiste em tratar o vinagre a temperaturas altas, durante um determinado período de tempo, de modo a destruir totalmente os microrganismos e desativar as enzimas que são predominantemente a causa mais importante das alterações (oxidação do ácido acético) do vinagre. O tratamento do vinagre mediante calor pode ser uma alternativa eficaz e segura para uma melhor conservação do produto (Suman, 2012). A pasteurização do vinagre pode ocorrer de duas formas - rápida e lenta. A rápida ocorre num intervalo de temperaturas de 75 ° a 80 °C, durante 30 a 40 segundos, e a lenta ocorre num intervalo de temperaturas de 50 ° a 65 °C, durante 20 a 30 minutos (Cruz, 2012).

## **1.10 Objetivos**

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar as características de produtos acetificados (vinagres) obtidos a partir de frutos fermentados (ameixa e framboesa), cerveja e gengibre, através da determinação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Ao longo do trabalho, pretendeu-se estudar diversas características físico-químicas dos vinagres, nomeadamente, o pH, acidez, °Brix, densidade, cor, composição de compostos fenólicos e flavonoides, bem como proceder à determinação da atividade antioxidante de cada vinagre.

Em relação aos parâmetros microbiológicos um dos principais objetivos foi estudar a qualidade microbiológica dos vinagres, através da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (MMA), bactérias ácido-láticas (BAL), fungos filamentosos, leveduras e bactérias acéticas (BA).

Por último, estabeleceu-se como objetivo deste trabalho, o estudo da atividade antimicrobiana dos vinagres sobre bactérias e leveduras, através do método da difusão em agar.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

Os vinagres estudados foram obtidos a partir de frutos fermentados (ameixa, e framboesa) e de cerveja e gengibre. Estes produtos foram processados através do método de Orleans e engarrafados numa empresa da região do Algarve (Algoz) e, comercializados com a marca “Fateixa”. Todos os vinagres foram adquiridos em garrafas de vidro de 250 ml.

### **2.2 Parâmetros Físico-Químicos**

Os reagentes utilizados para as determinações físico-químicas foram obtidos através de diversas fontes comerciais.

### 2.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada utilizando um medidor de pH de laboratório PHM 220 (MeterLAB), com o auxílio de um eletrodo e uma sonda de temperatura. Antes da determinação do valor de pH de cada amostra o aparelho foi calibrado utilizando duas soluções padrão, uma com pH 4 e outra com pH 7, encontrando-se a temperatura das soluções entre os 20 ° e 25 °C.

### 2.2.2 Determinação da Acidez Total

A acidez total (%) foi determinada por titulação de 1 ml da amostra de vinagre, ao qual se adicionou previamente 100 ml de água destilada e 4 a 5 gotas de solução de fenolftaleína alcoólica a 2% (May e Baker), usando uma solução 0,1 M de hidróxido de sódio (Riedel-de Haën) como titulante. A percentagem acidez de cada amostra de vinagre foi realizada em triplicado.

A percentagem de acidez é determinada a partir da seguinte equação:

$$Acidez (\%) = \frac{I.A.}{\rho \times 10} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde, I.A. é o índice de acidez (g/ml) e  $\rho$  é a densidade (g/ml) da amostra de vinagre.

O índice de acidez (I.A.) foi determinado através da seguinte equação:

$$I.A. = \frac{V_2 \times M \times 60}{V_1} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde,  $V_1$  é o volume (ml) da amostra de vinagre,  $V_2$  é o volume (ml) da amostra de NaOH, M é a molaridade (mol/ml) da solução titulante e 60 representa a massa molar (g/mol) do ácido acético.

### 2.2.3 Determinação do °Brix

A determinação do resíduo seco solúvel (°Brix) foi realizada de acordo com a NP 785 (IPQ, 1985).

Com uma pipeta colocou-se 1-2 gotas da amostra do vinagre na superfície do prisma do refratômetro ABBE (ATAGO 1T), fechando-se a tampa e ajustando-se com o botão de medida, de forma a ser possível ver uma imagem nítida do contraste da área clara/escura. Para cada amostra, as leituras dos valores Brix foram feitas a uma temperatura de 20 °C.

### 2.2.4 Determinação da Densidade

A densidade de cada amostra de vinagre foi determinada com um picnómetro (25 ml). O picnómetro foi calibrado com água destilada, ou seja, pesou-se o picnómetro vazio e de seguida encheu-se com água para a sua correta calibração. De seguida, descartou-se a água e com a ajuda de uma pipeta, colocou-se uma amostra de vinagre no picnómetro e procedeu-se à sua pesagem.

A densidade (g/ml) de cada amostra foi calculada através da seguinte equação 3:

$$\rho = \frac{P_a - P_p}{V_p} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde,  $\rho$  é a densidade (g/ml) da amostra de vinagre,  $P_a$  é o peso (g) do picnómetro contendo a amostra,  $P_p$  é o peso (g) do picnómetro vazio e  $V_p$  é o volume (ml) do picnómetro.

### 2.2.5 Determinação da Cor

As determinações de cor foram caracterizadas pela leitura direta de refletância do sistema de coordenadas retangulares “L\*” (luminosidade que varia entre preto (0) e branco (+100)), “a\*” (define a tonalidade da cor, varia de vermelho (+100) a verde (-100)) e “b\*” (define a intensidade ou pureza da cor - intensidade de amarelo (+100) a azul (-100)), “C\*” (saturação ou vivacidade da cor) e “h°” (tonalidade da cor). O colorímetro foi

previamente calibrado com os padrões de referência branco e preto. Foi aplicada a escala de Hunter, com iluminante D<sub>60</sub> e ângulo de observação de 10°, utilizando-se um colorímetro (PCE-CSM 10, PCE *Instruments spectrophotometer*). Para cada amostra de vinagre realizaram-se cinco leituras (El Sheikha *et al.* 2010).

### 2.2.6 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

A concentração total de compostos fenólicos nas amostras de vinagre foi determinada de acordo com Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos (1999). Adicionou-se a 0,2 ml de cada amostra de vinagre, 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Merck) (0,2 N) e 0,8 ml de solução saturada de carbonato de sódio (Merck) (7,5 %) e de seguida, agitou-se no vortex. A mistura reacional foi colocada em repouso durante 30 minutos e ao abrigo da luz e em seguida foi lida a absorvância a 765 nm num espectrofotómetro (Genesys 10UV).

A concentração em compostos fenólicos totais nas várias amostras de vinagres foi calculada com base numa curva de calibração de ácido gálico (Fluka) com diferentes concentrações (0,025; 0,05; 0,10; 0,15 mg/ml) e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/100 ml de amostra (figura 2.1).

Para a determinação dos compostos fenólicos totais a reta de calibração (equação 4) usada foi:

$$Abs\ 765\ nm = 7,6752 \times [Ácido\ Gálico] + 0,0189 \quad (Eq.\ 4)$$

Onde,  $R^2 = 0,9937$ .

### 2.2.7 Determinação dos Compostos Flavonoides Totais

A concentração em compostos flavonoides totais foi determinada com base no método descrito por Zhishen *et al.* (1999). Misturou-se a 1 ml da amostra de vinagre, 4 ml de água destilada, 0,3 ml de NaNO<sub>2</sub> (Riedel-de Haën) (5%), agitou-se a solução no vortex e esta permaneceu em repouso, no escuro, durante cerca de 5 minutos. De seguida adicionou-se 0,3 mL de AlCl<sub>3</sub> (Riedel-de Haën) (2%), agitou-se novamente no vortex e colocou-se a amostra novamente em repouso, no escuro, durante 6 minutos. Por fim, adicionou-se à

mistura 2 ml de NaOH (1 M) e 2,4 ml de água destilada e foi determinada a absorvância a 510 nm num espectrofotômetro (Genesys 10UV).

Os compostos flavonoides totais foram determinados com base numa reta de calibração de catequina (Sigma) com diferentes concentrações (10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg/ml) e os resultados foram expressos em mg de catequina/100 ml de amostra (figura 2.2).

Para a determinação dos compostos flavonoides a reta de calibração (equação 5) usada foi:

$$Abs\ 510\ nm = 0,0022 \times [Catequina] + 0,0079 \quad (Eq.\ 5)$$

Onde,  $R^2 = 0,9905$ .

### 2.2.8 Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante presente nas amostras de vinagre foi determinada através do método DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazilo) (Aldrich) de acordo com Bakir *et al.* (2017).

Em tubos de ensaio, misturaram-se 5 ml de DPPH e 0,1 ml da amostra e de seguida estes foram agitados no vortex, tendo sido colocadas as amostras, na ausência de luz, durante 13 minutos, num banho de água a 27 °C. Em seguida foram lidos os valores de absorvância a 515 nm num espectrofotômetro (Genesys 10UV).

A atividade antioxidante foi calculada com base numa reta de calibração utilizando-se o Trolox (Aldrich), como antioxidante padrão de referência, com diferentes concentrações (0,08, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4 mg/ml) e os resultados foram expressos em mg de Trolox/100 ml de amostra (figura 2.3).

Para a determinação da atividade antioxidante a reta de calibração (equação 6) usada foi:

$$Abs\ 515\ nm = -0,4504 \times [Trolox] + 0,5635 \quad (Eq.\ 6)$$

Onde,  $R^2 = 0,9948$ .

## **2.3 Parâmetros Microbiológicos**

Os microrganismos testados, bactérias e leveduras, foram repicados no Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Engenharia, na Universidade do Algarve.

Os meios de cultura e os discos de papel utilizados foram obtidos através de diversas fontes comerciais.

### **2.3.1 Avaliação da Qualidade Microbiológica**

A avaliação da qualidade microbiológica dos diferentes produtos foi realizada em três garrafas de cada vinagre. Para tal, estudaram-se os seguintes parâmetros microbiológicos: microrganismos mesófilos aeróbios (MMA), bactérias ácido-láticas (BAL), fungos filamentosos, leveduras e bactérias acéticas (BA). Todo o material usado, como pontas de pipetas, espalhadores, placas de Petri e gobelets, foi antecipadamente esterilizado.

Para realizar este estudo foram previamente preparados meios de cultura esterilizados e armazenados em refrigeração. Os meios preparados, foram: “Plate Count Agar” (PCA) (VWR), “Man Rogosa and Sharpe Agar” (MRS) (Scharlau), “Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol” (DRBC) (Biolife), “Malt Extract Agar” (ME) (Scharlau), e “Acid Acetic Bacteria Medium (BAA). O pH dos meios de cultura foi acertado com uma solução de ácido clorídrico 1M. Todos os vinagres foram diluídos 10 vezes ( $10^{-1}$ ), misturando 10 ml de cada um deles com 90 ml de solução de Ringer (Oxoid).

#### **2.3.1.1 Contagem de Microrganismos Mesófilos Aeróbios (MMA)**

A enumeração dos microrganismos mesófilos aeróbios (MMA) foi realizada de acordo com a norma ISO 4833-1 (ISO, 2013), com algumas alterações. Para a contagem deste grupo microbiano foi usado o meio de cultura PCA, com pH 5.5. Na superfície do meio de cultura inoculou-se 0,2 ml de vinagre puro, seguindo-se o espalhamento da amostra. Procedeu-se do mesmo modo para as diluições decimais dos vinagres. Os vinagres e as suas diluições foram inoculados em duplicado. As placas foram incubadas numa estufa a 30 °C, durante 72 h. Após o período de incubação fez-se o registo das contagens de colónias expressas em UFC/ml.

### **2.3.1.2 Contagem de Bactérias Ácido-Láticas (BAL)**

A enumeração das bactérias ácido-láticas (BAL) foi realizada de acordo com a norma ISO 15214 (ISO, 1998). Nas placas de Petri, vazias e estéreis, inoculou-se 1 ml do vinagre puro e de seguida incorporou-se o meio MRS fundido (pH 5,5) suplementado com ácido sórbico. Distribuiu-se uniformemente a amostra no meio de cultura realizando movimentos circulares suaves. Após a solidificação do meio de cultura adicionou-se uma segunda camada do mesmo meio. Procedeu-se do mesmo modo para as diluições decimais dos vinagres. Os vinagres e as suas diluições foram inoculados em duplicado. Após a solidificação da segunda camada de meio de cultura, as placas foram incubadas numa estufa a 30 °C, durante 72 h. Após o período de incubação fez-se o registo das contagens de colónias expressas em UFC/ml.

### **2.3.1.3 Contagem de Fungos Filamentosos**

A enumeração de fungos filamentosos foi realizada de acordo com a norma ISO 21527-2 (ISO, 2008). Para a contagem deste grupo microbiano foi usado o meio de cultura DRBC. Na superfície do meio de cultura inoculou-se 0,2 ml de vinagre puro, seguindo-se o espalhamento da amostra. Procedeu-se do mesmo modo para as diluições decimais dos vinagres. Os vinagres e as suas diluições foram inoculados em duplicado. As placas foram incubadas numa estufa a 25 °C, durante 5 a 7 dias. Após o período de incubação fez-se o registo das contagens de colónias expressas em UFC/ml.

### **2.3.1.4 Contagem de Leveduras**

A enumeração de leveduras foi realizada no meio de cultura ME com pH 5,5. Na superfície do meio de cultura inoculou-se 0,2 ml de vinagre puro, seguindo-se o espalhamento da amostra. Procedeu-se do mesmo modo para as diluições decimais dos vinagres. Os vinagres e as suas diluições foram inoculados em duplicado. As placas foram incubadas numa estufa a 25 °C, durante 5 a 7 dias. Após o período de incubação fez-se o registo das contagens de colónias expressas em UFC/ml.

### 2.3.1.5 Contagem de Bactérias Acéticas (BA)

A enumeração das bactérias produtoras de ácido acético foi realizada de acordo com o método descrito por Kim *et al.* (2019). Para a contagem deste grupo microbiano foi usado o meio de cultura BAA, sendo este constituído por: 50 g glucose (Scharlau), 10 g extrato de levedura (Biokar) 20 mg azul de bromofenol, 20 g agar, 950 ml água. Os ingredientes foram misturados e esterilizados na autoclave durante 15 minutos e após o arrefecimento a 50 °C num banho de água, adicionou-se, assepticamente, 1 ml ácido acético glacial (Merck), 50 ml etanol puro (Panreac). Na superfície do meio de cultura inoculou-se 0,2 ml de vinagre puro, seguindo-se o espalhamento da amostra. Procedeu-se do mesmo modo para as diluições decimais dos vinagres. Os vinagres e as suas diluições foram inoculados em duplicado. As placas foram incubadas numa estufa a 30 °C, durante 72 h. Após o período de incubação fez-se o registo das contagens de colónias expressas em UFC/ml. As colónias de bactérias acéticas distinguem-se pela sua cor verde e formação de halos amarelados, que as diferencia de outros microrganismos concorrentes. O azul de bromofenol, um indicador de pH usado neste meio, desempenha um papel fundamental na diferenciação destas colónias que adquirem uma cor verde com um halo amarelado, devido ao facto destes microrganismos serem produtores de ácido. Este meio seletivo é apropriado para o crescimento deste tipo de bactérias, o que permite ajudar os investigadores de laboratório a encontrá-las ou isolá-las, consoante a necessidade (Kim *et al.*, 2019).

## 2.4 Estudo da Atividade Antimicrobiana

As propriedades antimicrobianas de vinagres obtidos a partir de fermentados de ameixa, cerveja, gengibre e framboesa foram avaliadas em bactérias e leveduras.

Para esta avaliação testaram-se as seguintes bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028), *Listeria innocua* (ATCC 33090) e *Cronobacter sakazakii* (ATCC 29544). As culturas de bactérias foram testadas em meio de cultura sólido “Mueller-Hinton” (M.H.) (Oxoid) com pH 5,5, previamente preparado, esterilizado e armazenado em refrigeração.

No caso das leveduras, as espécies estudadas foram *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Cryptococcus neoformans* (YPO 186), *Saccharomyces cerevisiae* (PYCC 3507), *Pichia membranifaciens* (PYCC 2489), *Zygosaccharomyces bailii* (PYCC 4806), *Debaryomyces hansenii* (PYCC 2968). Inicialmente o estudo foi realizado em dois meios de cultura diferentes, o meio “Mueller-Hinton” com a adição de 2% de glucose (M.H. 2% G) e o meio “Yeast Mold Agar” (YM) (Pronadisa). Porém, após os primeiros testes, as estirpes de *Candida albicans*, foram testadas em M. H. 2%, e as restantes espécies foram estudadas no meio YM. Estes meios de cultura foram previamente preparados, esterilizados e armazenados em refrigeração. O pH de todos os meios de cultura foi ajustado a um valor de 5,5.

A atividade antimicrobiana dos vinagres foi realizada através do método de Kirby-Bauer, também designado por método de difusão em agar, de acordo com os protocolos do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST 2000). Prepararam-se suspensões, estéreis, em tubos de 5 ml com solução salina (0,85% NaCl) dos microrganismos a testar, tendo-se recolhido as colónias necessárias de modo a obter suspensões microbianas com uma turvação correspondente ao padrão 0,5 de Mc Farland (Biomérieux). As placas de Petri com os respetivos meios foram inoculadas utilizando zaragatoas estéreis, que foram mergulhadas na suspensão microbiana anteriormente preparada. Após a inoculação, colocou-se em cada quadrante da placa discos de papel (Oxoid; 6 mm de diâmetro), esterilizados. Os discos foram impregnados com 20 µL de cada um dos vinagres em estudo. Preparou-se ainda, um disco impregnado com 20 µL de solução salina estéril (controlo negativo).

Tanto para as bactérias, como para as leveduras testaram-se, respetivamente, antibióticos e antimicóticos de referência com concentrações específicas (controlos positivos). No caso das bactérias utilizaram-se quatro antibióticos diferentes, nomeadamente a ampicilina (10 µg/disco) (Oxoid), a penicilina G [10 unidades (U)/ disco] (Oxoid), a cloranfenicol (30 µg/disco) (Oxoid) e a eritromicina (15 µg/disco) (Liofilchem). Para as leveduras usaram-se três antimicóticos de referência, a anfotericina B (10 µg/disco) (Liofilchem), o fluconazol (25 µg/disco) (Oxoid) e a nistatina [100 unidades (U) disco] (Oxoid). Estes discos de antibióticos e antimicóticos também foram colocados nas placas de Petri previamente inoculadas com a suspensão do microrganismo pretendido, como descrito anteriormente para as amostras de vinagre. Depois da inoculação e após cerca de 15 minutos, as placas inoculadas foram incubadas a 30 °C. No caso das bactérias, a

incubação decorreu durante um período de 24 h e no caso das leveduras, durante 48 h. Após o período de incubação registaram-se os valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (em mm), para as bactérias e para as leveduras, sendo que estas últimas foram logo de seguida colocadas na incubadora para completar o restante tempo de incubação (48 h) e, aquando as 48 h mediram-se, novamente, os diâmetros dos halos de inibição.

## **2.5 Análise Estatística**

Os valores experimentais foram representados como a média de várias medidas (consoante o método de análise)  $\pm$  o desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, tanto para os resultados dos parâmetros físico-químicas, como para os microbiológicos, e as médias foram comparadas através do teste post-hoc de comparações múltiplas de Tukey quando a ANOVA se revelou significativa. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . A análise estatística foi feita usando o software SPSS versão 28.0 (IBM SPSS Statistics 28.0).

# **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1 Parâmetros Físico-Químicos**

As amostras de vinagre obtidas a partir de ameixa, cerveja, framboesa e gengibre foram estudadas de forma comparada, em relação aos parâmetros de pH, acidez, °Brix, compostos fenólicos, compostos flavonoides, atividade antioxidante e cor.

### **3.1.1 Caraterísticas Físico-Químicas dos Vinagres**

As caraterísticas físico-químicas, nomeadamente o pH, acidez total e °Brix, dos diferentes vinagres estão apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Características físico-químicas dos diferentes vinagres

Parâmetros	Ameixa	Cerveja	Gengibre	Framboesa
pH	3,07±0,04 <sup>b</sup>	2,77±0,03 <sup>a</sup>	3,03±0,01 <sup>b</sup>	3,30±0,00 <sup>c</sup>
Acidez (g/100 ml ácido acético)	5,25±0,17 <sup>a</sup>	5,56±0,10 <sup>b</sup>	5,62±0,06 <sup>b</sup>	6,82±0,06 <sup>c</sup>
°Brix	6,45±0,071 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>a</sup>	4,95±0,07 <sup>a</sup>	5,50±0,00 <sup>b</sup>

Os valores representam médias±desvios-padrão das amostras. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p<0,05$ )

Os valores de pH e de acidez dos vinagres estão compreendidos entre 2,77 a 3,30 e 5,25 a 6,82 % de ácido acético, respetivamente. Avaliou-se a conformidade das amostras de vinagre quanto ao limite mínimo legal estabelecido, de acordo com o Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio, relativamente à acidez total (5 g/ 100 ml) e verificou-se que todas as amostras cumprem o determinado neste requisito. Já no estudo de Bakir *et al.* (2017), o intervalo dos valores de pH e da acidez situava-se entre 2,8 a 3,9 e 0,7 a 6,6 % de ácido acético, respetivamente, constatando-se que nem todos os tipos de vinagre cumprem com o requisito legal estabelecido. Porém, em Ozturk *et al.* (2015), o pH e a acidez total de amostras de vinagres tradicionais e industriais variaram de 2,63 a 3,90 e 0,32 a 7,20% de ácido acético, respetivamente, verificando-se que a maioria dos vinagres tradicionais, cerca de 80%, não estava conforme o valor estabelecido, no caso, pelo menos 4% de ácido acético, conforme dispõem as normas reguladoras da Turquia e Estados Unidos (Sengun *et al.*, 2020).

Em Sengun *et al.* (2020), o valor pH e acidez total das amostras de vinagre varia de 3,22 a 3,85 e 1,11 a 5,61 % de ácido acético, respetivamente, verificando-se grande discrepância de conformidade, em função da regulamentação aplicada. Em correspondência com o estabelecido pelo Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio, apenas 10% dos vinagres estão conforme os requisitos definidos, já mediante aplicação da legislação da Turquia e Estados Unidos, 90% dos produtos estão conformes.

No que se refere ao pH, os vinagres de ameixa e gengibre não são significativamente diferentes ( $p>0,05$ ), e já no que se refere à acidez, o mesmo se pode concluir relativamente à acidez total dos vinagres de cerveja e gengibre ( $p>0,05$ ).

Relativamente ao vinagre de framboesa, o mesmo é significativamente diferente ( $p<0,05$ ) de todas as amostras, revelando valores mais elevados tanto para o pH, como para a acidez.

Relativamente ao °Brix, este representa a percentagem de um resíduo seco solúvel e é um parâmetro que se altera em função do tipo de vinagre (Sengun *et al.*, 2020). Ozturk (2020) conclui que o °Brix indica a percentagem de sólidos solúveis incluindo açúcares, sais e proteínas numa amostra líquida. No entanto, representa habitualmente, açúcares equivalentes em amostras como as dos vinagres, omitindo outros materiais solúveis.

No estudo desenvolvido, conforme dados da tabela 3.1, os valores de °Brix compreendem-se entre 4,95 a 6,45, correspondendo respetivamente, aos vinagres de gengibre e ameixa. Curiosamente, no estudo de Sengun *et al.* (2020), tendo por base os vinagres analisados, também a ameixa corresponde ao valor de °Brix mais elevado de todos os vinagres (5,00).

Os vinagres de cerveja e gengibre foram os que apresentaram os valores mais baixos de °Brix e, não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) entre si, contrariamente ao vinagre de ameixa ( $p < 0,05$ ) que apresentou o valor mais alto.

No estudo de Ozturk *et al.* (2015), os valores de °Brix em vinagres, demonstraram uma acentuada variação, de 1,02 a 20,80. De acordo com os autores, os valores do °Brix estão fortemente relacionados com a fermentação, ao nível do decréscimo dos açúcares e também com a atividade dos microrganismos na fermentação, sendo que as culturas iniciais (“starter”) e a matéria-prima são outros dos fatores responsáveis pela variabilidade dos valores do °Brix nos diferentes vinagres.

### 3.1.2 Bioatividade dos Vinagres

As características bioativas, nomeadamente os compostos fenólicos, flavonoides e a atividade antioxidante (DPPH) dos diferentes vinagres estão presentes na tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Bioatividade dos diferentes vinagres

Parâmetros	Ameixa	Cerveja	Gengibre	Framboesa
Compostos Fenólicos Totais (mg ácido gálico/100 ml)	0,51±0,02 <sup>b</sup>	0,62±0,06 <sup>c</sup>	0,25±0,01 <sup>a</sup>	0,55±0,01 <sup>b,c</sup>
Compostos Flavonoides Totais (mg catequina/100 ml)	86,41±10,93 <sup>b</sup>	52,32±1,93 <sup>a</sup>	50,73±12,54 <sup>a</sup>	161,64±11,25 <sup>c</sup>
Atividade Antioxidante (DPPH, mg Trolox / 100 ml)	0,10±0,01 <sup>c</sup>	0,04±0,00 <sup>b</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	0,28±0,02 <sup>d</sup>

Os valores representam médias±desvios-padrão das amostras. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

O menor teor de compostos fenólicos e flavonoides totais foi detetado no vinagre de gengibre, apresentando valores de 0,25 mg de ácido gálico/ml e 50,73 mg de catequina/ml, respetivamente. Estas características bioativas refletem valores mais elevados para o vinagre de cerveja (0,62 mg de ácido gálico/ml) e de framboesa (161,64 mg de catequina/ml). Em relação aos compostos fenólicos totais, o vinagre de framboesa não é, simultaneamente, significativamente diferente ( $p > 0,05$ ) ao de ameixa e cerveja. Já nos compostos flavonoides totais, os vinagres de cerveja e gengibre não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Com base nos resultados obtidos não foi possível observar uma tendência clara entre os parâmetros, no entanto, o vinagre de gengibre foi aquele que sempre apresentou valores mais baixos para todos eles.

No estudo de Ozturk *et al.* (2015) no que se refere às amostras dos vinagres estudados, os valores dos compostos fenólicos e flavonoides variaram entre 0,040 a 2,229 mg de ácido gálico/ml e 0,011 a 0,349 mg de catequina/ml, respetivamente. No estudo de Sengun *et al.* (2020) verificou-se que os valores dos fenólicos se situam na linha de valores compreendidos entre 0,933 e 1,162 mg de ácido gálico/ml e os compostos flavonoides no intervalo 0,067 e 0,471 mg de catequina/ml. Em Bakir *et al.* (2017) o intervalo de valores referentes para estas propriedades bioativas mostrou ser mais elevado, visto que, para os compostos fenólicos, os valores encontram-se entre de 17 e 255 mg de ácido gálico/ml e para os compostos flavonoides entre 2,4 e 96 mg de catequina/ml.

A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH e os valores variaram de 0,01 a 0,28 mg trolox/ml, sendo que correspondem ao vinagre de gengibre e de framboesa, respetivamente. Neste parâmetro, podemos considerar todos os vinagres estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

Nos estudos de Bakir *et al.* (2017) e Sengun *et al.* (2020), os valores da atividade antioxidante dos vinagres foram bastante diferentes entre si, sendo que no primeiro os valores compreendem-se entre 13 e 517 mg trolox/ml e no segundo, num intervalo entre 0,1302 e 0,047  $\mu$ g trolox/ml.

As grandes discrepâncias de resultados nestas propriedades bioativas dependem, em grande parte, da composição e estado de maturação da matéria-prima, das técnicas de produção, bem como, das condições de envelhecimento do vinagre (Ozturk *et al.*, 2015; Cruz, 2012).

### 3.1.3 Propriedades da Cor dos Vinagres

Os parâmetros de cor dos vinagres apresentam-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Parâmetros de cor dos diferentes vinagres

Parâmetros	Ameixa	Cerveja	Gengibre	Framboesa
L*	28,49±0,16 <sup>c</sup>	28,19±0,27 <sup>b</sup>	28,22±0,27 <sup>b, c</sup>	27,71±0,24 <sup>a</sup>
a*	-0,17±0,05 <sup>b</sup>	-0,34±0,07 <sup>a</sup>	-0,41±0,07 <sup>a</sup>	0,20±0,14 <sup>c</sup>
b*	3,13±0,11 <sup>b</sup>	3,11±0,16 <sup>b</sup>	2,06±0,08 <sup>a</sup>	3,26±0,15 <sup>b</sup>
C*	3,13±0,10 <sup>b</sup>	3,12±0,16 <sup>b</sup>	2,10±0,08 <sup>a</sup>	3,27±0,16 <sup>b</sup>
h°	93,00±0,99 <sup>b</sup>	96,08±1,36 <sup>c</sup>	101,24±1,88 <sup>d</sup>	86,58±2,35 <sup>a</sup>

Os valores representam a média±desvio-padrão das amostras. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p<0,05$ )

As propriedades da cor foram avaliadas quanto à coordenada L\* (luminosidade), a\* (componente de cor verde/vermelha), b\* (componente de cor azul/amarela), C\* (saturação de cor) e h° (tonalidade) e os valores estão compreendidos entre 27,71 e 28,49; -0,41 e 0,20; 2,06 e 3,26; 2,10 e 3,27; 86,58 e 101,24, respectivamente.

Para a coordenada L\* verifica-se que o vinagre de framboesa é estatisticamente diferente ( $p<0,05$ ) do resto das amostras e, portanto, tem menor luminosidade. No entanto, para o vinagre de ameixa, é possível confirmar que este tem o valor mais alto, não sendo significativamente diferente ( $p>0,05$ ) ao vinagre de gengibre que, por sua vez, também não o é em relação ao de cerveja. Para as coordenadas a\*, b\* e C\* verificou-se a mesma tendência para os vinagres de framboesa e gengibre, sendo que no que se refere ao primeiro, os valores obtidos foram sempre os mais altos e no segundo, os mais baixos. Relativamente à coordenada a\*, o vinagre de gengibre mostrou não ser significativamente diferente ( $p>0,05$ ) do de cerveja, sendo que o vinagre de ameixa e o de framboesa são diferentes ( $p<0,05$ ) entre todos. Já no que às coordenadas b\* e C\* diz respeito, constata-se que os vinagres de ameixa, cerveja e framboesa não são estatisticamente diferentes ( $p>0,05$ ) entre si, sendo que o de gengibre é ( $p<0,05$ ), em relação a todos os outros. No que se refere ao ângulo de tonalidade, h°, o vinagre de gengibre é aquele que apresenta

um maior ângulo em oposição ao vinagre de framboesa. Neste parâmetro todas as amostras de vinagre se mostraram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre si.

Num estudo de Hammouda *et al.* (2021) também foram estudadas as propriedades de cor em vinagres (uva, figo, figo da Índia e tâmara) e os valores das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  correspondiam, respectivamente, aos seguintes intervalos: 0,13 a 68,83; 1,15 a 9,98; 0,34 a 30,34. De acordo com os autores, os valores das coordenadas  $L^*$  e  $b^*$  estavam em concordância com o aspeto visual, tendo sido o vinagre de uva a apresentar os valores superiores, enquanto que para a coordenada  $a^*$  o seu maior valor foi registado para o vinagre de figo. Os valores de  $C^*$  e  $h^\circ$  foram variáveis entre as amostras de vinagre, indicando, assim, que as propriedades de cor das amostras eram muito diferentes umas das outras. Estes autores justificam essa diferença como resultado, provavelmente, do conteúdo de fitoquímicos nas matérias-primas que influenciam a cor do produto final do vinagre. Em Ozturk *et al.* (2015), os valores de  $L^*$  variaram entre 0,28 e 20,15. Os vinagres tradicionais de maçã alcançaram valores de  $L^*$  extraordinariamente altos, de forma bastante generalizada. Os valores de  $a^*$  e  $b^*$  presentes nas amostras variaram bastante ( $a^* = -0,54$  a 14,88;  $b^* = 0,43$  a 14,11) no conjunto das amostras, indicando grande diferença das propriedades de cor dos vinagres, entre si.

Já segundo Sengun *et al.* (2020) e considerando que as propriedades de cor dos vinagres de fruta fornecidas por  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  variam entre 3,11 a 8,17; -1,50 a 0,60 e 0,82 a 3,47, respectivamente, verifica-se que, em todas as amostras, os valores de  $L^*$  são mais altos em vinagres de uva e de figo, enquanto que, no que se refere aos valores de  $a^*$  e  $b^*$ , é o vinagre de amora a alcançar os valores mais altos, concluindo desta forma, que os resultados obtidos não evidenciam uma correlação entre os valores da cor e os compostos totais de fenólicos e flavonoides contidos nos vinagres.

### **3.2 Parâmetros microbiológicos: Avaliação da Qualidade dos Vinagres**

A qualidade microbiológica dos vinagres foi estudada através da enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos (MAM), bactérias ácido-lácticas (BAL), fungos filamentosos, leveduras e bactérias acéticas. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Contagem (UFC/ml) dos microrganismos nos diferentes vinagres (n=3)

<b>Microrganismos</b>	Ameixa	Cerveja	Gengibre	Framboesa
Microrganismos Mesófilos Aeróbios	<1	<1	<1	<1
Bactérias Ácido-Lácticas	<1	<1	<1	<1
Bactérias Acéticas	<1	<1	<1	<1
Fungos Filamentosos	<1	<1	<1	<1
Leveduras	<1	<1	<1	<1

As amostras testadas de vinagre de ameixa, cerveja, gengibre e framboesa não apresentaram qualquer tipo de crescimento microbiano, conforme se pode observar na Tabela 3.4. O número dos vários grupos microbianos estudados encontrava-se em todos os vinagres, abaixo do limite de detecção (1 UFC/ml).

De acordo com o estudo de Ozturk *et al.* (2015), que consistia em comparar vinte vinagres tradicionais com cinco vinagres produzidos industrialmente, cerca de 52% das amostras, nove vinagres tradicionais e quatro industriais, apresentaram valores abaixo dos limites de detecção para as contagens de bactérias ácido-lácticas (BAL). Esta percentagem de amostras também se verificou para as bactérias acéticas (BA), no entanto para estas bactérias os valores abaixo do limite de detecção verificaram-se para oito vinagres tradicionais e cinco industriais. No que diz respeito a leveduras e fungos filamentosos 64% das amostras, das quais doze vinagres tradicionais e quatro vinagres produzidos industrialmente, apresentaram valores abaixo do limite de detecção. No resto das amostras, as contagens de BA foram relativamente mais elevadas do que em BAL, leveduras e fungos. Em 36% das amostras (nove vinagres tradicionais) foi possível detetar, em simultâneo, populações de BAL e BA, em que os níveis de detecção variam entre os valores  $2,6 \times 10^3$  UFC e  $1,1 \times 10^9$  UFC/ml, enquanto que 28% das amostras (quatro vinagres tradicionais e três vinagres industriais) não apresentaram qualquer tipo de crescimento microbiano considerável tanto para as contagens de BAL, BA, leveduras e fungos, isto é, os valores foram <10 UFC/ml. De acordo com os autores do estudo, o estado microbiológico do vinagre pode mudar dependendo de condições intrínsecas (composição do meio) e de parâmetros extrínsecos, como a temperatura e a humidade. Como o etanol e ácido são produzidos nas etapas iniciais da fermentação alcoólica, principalmente por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e BAL, respetivamente, estes

compostos inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis e prolongam a vida útil do vinagre. Posteriormente, na segunda fase do processamento do vinagre, o ácido acético é produzido por BA e inibe os microrganismos intolerantes ao ácido. No entanto, existe um grande risco de deterioração do vinagre produzido por fermentação natural devido à dificuldade de controlar todas as etapas do processamento.

No estudo de Sengun (2013) um dos principais objetivos foi estudar as propriedades microbiológicas de vinagres tradicionais utilizando diferentes tipos de matérias-primas assim como diferentes condições de fermentação. As contagens de leveduras das amostras variaram entre 0,00 a 6,49 log UFC/ml, enquanto que não foi observado crescimento de fungos filamentosos em oito amostras de vinagres. Para as amostras de vinagre de figo seco e de figo fresco não houve crescimento de leveduras, enquanto que para as restantes amostras as contagens de leveduras foram significativamente diferentes umas das outras (valores entre 2,49 log UFC/ml e 6,49 log UFC/ml). Neste estudo as BAL foram enumeradas, também, no meio MRS (pH 6,2) e as suas contagens variaram de 0,81 log UFC/ml a 8,20 log UFC/ml. De acordo com o autor, a contagem mais alta de BAL estará relacionada com a acidez da amostra, porque neste caso, a amostra com uma maior população de BAL também apresentava uma maior acidez em relação às restantes amostras. É relatado que as populações de BA apresentam números muito altos em amostras de vinagre, como  $10^8$  células/ml (Torija *et al.*, 2010), no entanto no estudo de Sengun (2013) contaram-se valores inferiores na maioria das amostras e, a razão para tal, dever-se-á às propriedades extremas do vinagre e à quantidade significativa de microbiota que não pode ser cultivada nas condições laboratoriais atualmente disponíveis. Em relação às BA, o seu cultivo, isolamento e identificação são particularmente difíceis em fermentações naturais (espontâneas), onde podem estar presentes no estado viável, mas não cultivável e podem estar em competição com outros grupos microbianos (Milanović *et al.*, 2018).

No estudo de Sengun (2013), tal como no presente estudo, não foram detetados fungos nas amostras estudadas o que, de acordo o autor, poderá significar que os vinagres analisados foram produzidos em condições higiénicas e de fermentação adequadas. Por outro lado, a composição química do produto final, como o seu alto valor em ácidos, também pode afetar a qualidade microbiológica das amostras e, assim, apresentar o efeito bactericida ou bacteriostático contra os microrganismos patogénicos e deteriorantes. Atente-se que os vinagres utilizados no presente estudo foram submetidos durante o seu

processamento a diversas operações tecnológicas de diminuição da carga microbiana tais como a filtração e a pasteurização.

### 3.3 Estudo da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos vinagres de ameixa, cerveja, gengibre e framboesa foi estudada através do método de difusão em agar em bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Bacillus cereus* (ATCC 10876)) em bactérias Gram-negativas (*Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* (ATCC 29544) *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)) e ainda em diferentes espécies de leveduras (*Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Cryptococcus neoformans* (YPO 186), *Saccharomyces cerevisiae* (PYCC 3507), *Pichia membranifaciens* (PYCC 2489), *Zygosaccharomyces bailii* (PYCC 4806) *Debaryomyces hansenii* (PYCC 2968)).

#### 3.3.1 Efeito dos Vinagres em Bactérias

As tabelas 3.5 e 3.6 mostram, respectivamente, o efeito dos antibióticos e dos vinagres contra as bactérias.

Tabela 3.5 - Atividade antimicrobiana dos antibióticos contra as bactérias (n=6)

Bactérias	Ampicilina	Penicilina	Cloranfenicol	Eritromicina
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	36,15±2,45 <sup>c</sup>	42,20±1,80 <sup>d</sup>	31,10±2,12 <sup>b</sup>	19,70±1,25 <sup>a</sup>
<i>L. innocua</i> (ATCC 33090)	35,70±4,32 <sup>b</sup>	36,55±5,14 <sup>b</sup>	35,25±1,99 <sup>b</sup>	25,00±2,37 <sup>a</sup>
<i>C. sakazakii</i> (ATCC 29544)	28,10±1,79 <sup>b</sup>	8,38±1,51 <sup>a</sup>	30,15±0,71 <sup>c</sup>	-
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	30,10±1,65 <sup>b</sup>	19,10±2,32 <sup>a</sup>	32,95±2,01 <sup>c</sup>	-
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	24,15±1,63 <sup>b</sup>	7,88±0,63 <sup>a</sup>	32,45±1,92 <sup>c</sup>	-
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	28,80±3,02 <sup>b</sup>	23,22±1,79 <sup>a</sup>	36,39±2,78 <sup>c</sup>	23,83±2,57 <sup>a</sup>
<i>B. cereus</i> (ATCC 10876)	28,83±9,46 <sup>a,b</sup>	22,41±7,15 <sup>a</sup>	31,82±3,54 <sup>b</sup>	23,27±1,44 <sup>a</sup>
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	-	12,36±1,95 <sup>a</sup>	19,50±4,23 <sup>b</sup>

Os valores representam médias±desvios-padrão dos halos inibitórios e estão expressos em milímetros (mm); (-): ausência de halo. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p<0,05$ )

A penicilina foi o antibiótico que mostrou ser mais eficaz contra *S. aureus* ( $42,20 \pm 1,80$  mm) - figura 3.1, e *L. innocua* ( $36,55 \pm 5,14$  mm), no entanto para *E. coli* ( $7,88 \pm 0,63$  mm) - figura 3.2 e *C. sakazakii* ( $8,38 \pm 1,51$  mm) induziu halos inibitórios muito pequenos e não formou halos para *P. aeruginosa*. O cloranfenicol foi aquele que mais conseguiu inibir *C. sakazakii* ( $30,15 \pm 0,71$  mm). Já a eritromicina não teve qualquer ação para esta bactéria como, também, para *S. Typhimurium* e *E. coli*. A eritromicina obteve os maiores halos contra a *L. innocua* ( $25,00 \pm 2,37$  mm) - figura 3.3, *S. epidermidis* ( $23,83 \pm 2,57$  mm) e *B. cereus* ( $23,27 \pm 1,44$  mm).

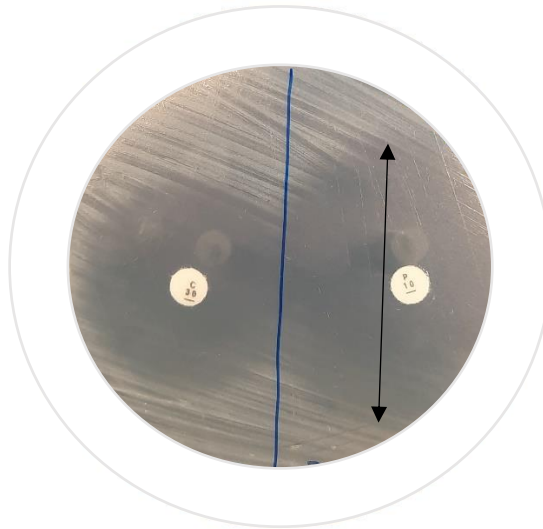


Figura 3.1 - Efeito da penicilina em *S. aureus*



Figura 3.2 - Efeito da penicilina em *E. coli*



Figura 3.3 - Efeito da eritromicina em *L. innocua*

De acordo com o presente estudo, *S. aureus* e *L. innocua* são mais sensíveis à penicilina e mais tolerantes à eritromicina. *C. sakazakii*, *S. Typhimurium* e *E. coli* mostraram resistência à eritromicina e uma sensibilidade ao cloranfenicol. *S. epidermidis* (figura 3.4) e *B. cereus* são mais resistentes à penicilina e sensíveis ao cloranfenicol. *P. aeruginosa* foi a que mostrou maior sensibilidade à eritromicina e tolerância à ampicilina e penicilina.

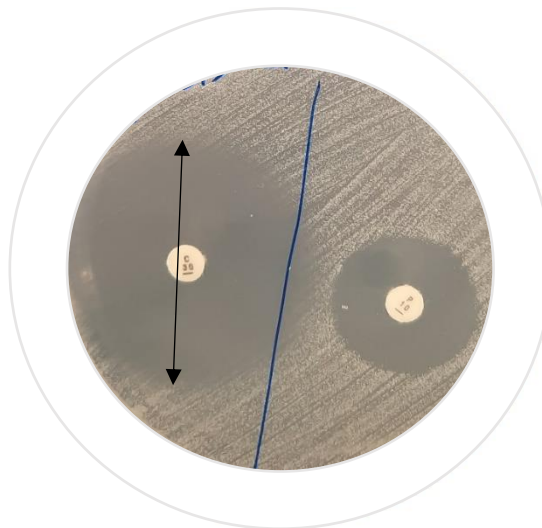


Figura 3.4 - Efeito do cloranfenicol em *S. epidermidis*

Tabela 3.6 - Atividade antimicrobiana dos diferentes vinagres contra as bactérias (n=6)

Bactérias	Ameixa	Cerveja	Gengibre	Framboesa
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	25,00±0,00 <sup>a</sup>	28,33±2,89 <sup>a,b</sup>	30,50±1,00 <sup>b</sup>	28,75±2,63 <sup>a,b</sup>
<i>L. innocua</i> (ATCC 33090)	26,00±0,00 <sup>a</sup>	29,33±0,58 <sup>b</sup>	29,00±1,26 <sup>b</sup>	29,75±1,89 <sup>b</sup>
<i>C. sakazakii</i> (ATCC 29544)	11,33±0,58 <sup>a</sup>	11,67±0,58 <sup>a</sup>	12,75±1,71 <sup>a</sup>	17,33±4,18 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	12,67±1,53 <sup>a</sup>	10,00±0,00 <sup>a</sup>	13,33±2,66 <sup>a</sup>	13,50±1,29 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	16,33±1,15 <sup>a</sup>	19,33±2,08 <sup>a,b</sup>	27,33±0,58 <sup>c</sup>	24,83±3,87 <sup>b,c</sup>
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	29,67±0,58 <sup>b</sup>	29,00±1,00 <sup>b</sup>	23,80±2,39 <sup>a</sup>	29,25±1,50 <sup>b</sup>
<i>B. cereus</i> (ATCC 10876)	22,00±3,46 <sup>a</sup>	21,00±1,73 <sup>a</sup>	25,00±0,00 <sup>a,b</sup>	28,67±2,31 <sup>b</sup>
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	28,40±3,21 <sup>a</sup>	30,00±5,77 <sup>a</sup>	39,00±1,00 <sup>b</sup>	32,20±3,03 <sup>a,b</sup>

Os valores representam médias±desvios-padrão dos halos inibitórios e estão expressos em milímetros (mm). Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p<0,05$ )

Os resultados resumidos na tabela 3.6 revelaram que as amostras de vinagre apresentaram, de um modo geral, uma capacidade de inibição do crescimento das bactérias relevante e que, quanto maior a acidez, maior a capacidade inibitória dos vinagres em estudo. Em alguns casos registaram-se halos de inibição do crescimento superiores aos induzidos por alguns antibióticos (pe. a eritromicina). De uma forma geral, as bactérias Gram-negativas, com exceção de *P. aeruginosa*, apresentaram halos de inibição do crescimento inferiores aos apresentados pelas bactérias Gram-positivas.

O vinagre de ameixa induziu a formação dos maiores halos de inibição na espécie *S. epidermidis* (29,67±0,58 mm) - figura 3.5, seguindo-se *P. aeruginosa* (28,40±3,21 mm) e *L. innocua* (26,00±0,00 mm). As bactérias que se mostraram menos sensíveis a este vinagre foram as Gram-negativas, *C. sakazakii* (11,33±0,58 mm) - figura 3.6, *S. Typhimurium* (12,67±1,53 mm) e *E. coli* (16,33±1,15 mm).



Figura 3.5 - Efeito do vinagre de ameixa em *S. epidermidis*

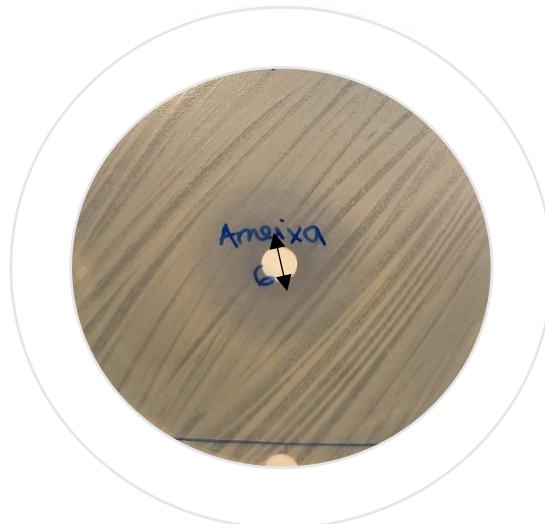


Figura 3.6 - Efeito do vinagre de ameixa em *C. sakazakii*

O vinagre de cerveja causou uma forte inibição do crescimento de *P. aeruginosa* ( $30,00 \pm 5,77$  mm) - figura 3.7, *S. epidermidis* ( $29,00 \pm 1,00$  mm), *L. innocua* ( $29,33 \pm 0,58$  mm) e *S. aureus* ( $28,33 \pm 2,89$  mm). *S. Typhimurium* foi a menos inibida ( $10,00 \pm 0,00$  mm) - figura 3.8, em relação ao vinagre de cerveja, seguida de *C. sakazakii* ( $11,67 \pm 0,58$  mm).

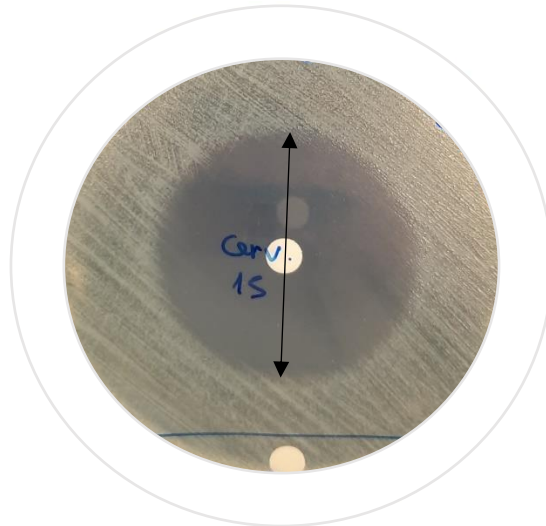


Figura 3.7 - Efeito do vinagre de cerveja em *P. aeruginosa*

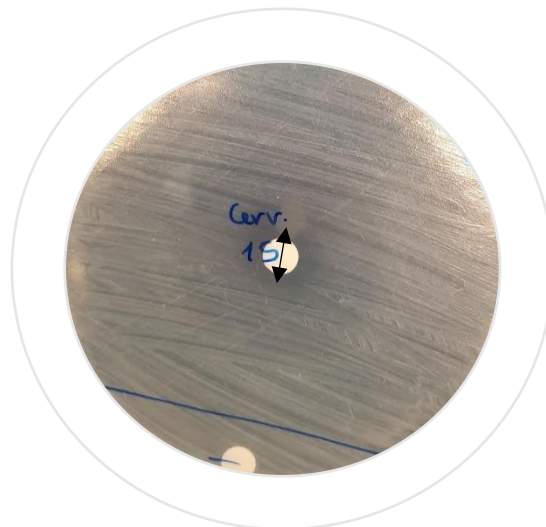


Figura 3.8 - Efeito do vinagre de cerveja em *S. Typhimurium*

O vinagre de gengibre produziu o maior halo de todos os ensaios realizados ( $39,00 \pm 1,00$  mm) na bactéria *P. aeruginosa* (figura 3.9). Este vinagre, também mostrou ter uma ação inibitória maior do que todos os outros vinagres contra *E. coli* ( $27,33 \pm 0,58$  mm), *S. aureus* ( $30,50 \pm 1,00$  mm) e *L. innocua* ( $29,00 \pm 1,26$  mm). As bactérias *C. sakazakii* e *S. Typhimurium* mostraram-se mais tolerantes a este vinagre ( $12,75 \pm 1,71$  mm e  $13,33 \pm 2,66$  mm, respetivamente) - figura 3.10.



Figura 3.9 - Efeito do vinagre de gengibre em *P. aeruginosa*



Figura 3.10 - Efeito do vinagre de gengibre em *C. sakazakii* e *S. Typhimurium*

O vinagre de framboesa foi o que apresentou os melhores resultados em relação às bactérias *L. innocua* ( $29,75 \pm 1,89$  mm), *B. cereus* ( $28,67 \pm 2,31$  mm), *C. sakazakii* ( $17,33 \pm 4,18$  mm) e *S. Typhimurium* ( $13,50 \pm 1,29$  mm) - figura 3.11, que se mostraram mais sensíveis para este produto do que para os outros vinagres testados. Este vinagre também apresentou boas capacidades de inibição do crescimento de *S. aureus* ( $28,75 \pm 2,63$  mm), *E.coli* ( $24,83 \pm 3,87$  mm), *S. epidermidis* ( $29,25 \pm 1,50$  mm) e *P. aeruginosa* ( $32,20 \pm 3,03$  mm) - figura 3.12.

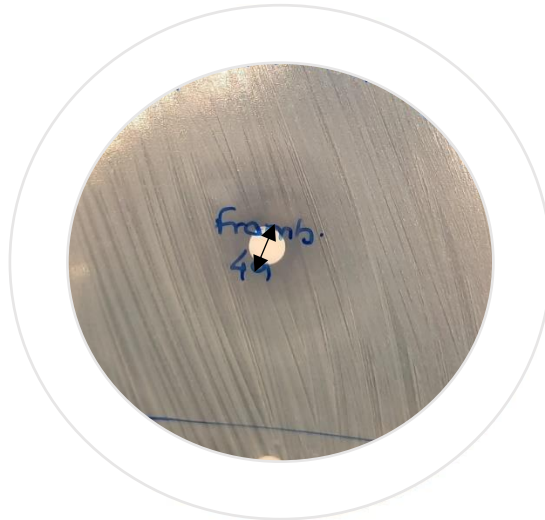


Figura 3.11 - Efeito do vinagre de framboesa em *S. Typhimurium*



Figura 3.12 - Efeito do vinagre de framboesa em *P. aeruginosa*

Os vinagres de framboesa e de gengibre caracterizaram-se por possuírem uma acidez superior aos outros vinagres testados assim como um valor de pH inferior, justificando assim as capacidades de inibição das bactérias superiores que apresentaram.

De uma forma geral, na presença dos vinagres em estudo, as bactérias Gram-positivas apresentaram halos de inibição do crescimento superiores aos apresentados pelas bactérias Gram-negativas, com exceção de *P. aeruginosa*. O crescimento da bactéria *S. aureus* foi mais fortemente inibido pelo vinagre de gengibre ( $30,50 \pm 1,00$  mm), no entanto os vinagres de cerveja e framboesa também causaram halos de inibição do crescimento da bactéria que não foram significativamente diferentes dos induzidos pelo vinagre de

gingibre ( $p>0,05$ ). *L. innocua* foi inibida ( $p>0,05$ ) em níveis semelhantes pelos vinagres de cerveja, gengibre e framboesa os quais causaram halos de inibição do crescimento de 29,33 mm, 29,00 mm, 29,75 mm, respetivamente. Relativamente a *S. epidermidis* os maiores níveis de inibição observaram-se na presença de vinagres de ameixa, cerveja e framboesa que resultaram em diâmetros de halos semelhantes ( $p>0,05$ ) de 29,67 mm, 29,00 mm, 29,25 mm, respetivamente. Os vinagres de framboesa e gengibre foram os que causaram maior nível de inibição do crescimento na bactéria Gram-positiva *B. cereus*, dando origem a halos de 28,67 mm e 25,00 mm, não havendo diferenças significativas entre estes valores ( $p>0,05$ ).

As bactérias Gram-negativas *C. sakazakii* e *S. Typhimurium*, foram as que apresentaram halos de inibição do crescimento menores, imediatamente seguidas de *E. coli*, permitido afirmar que as bactérias Gram-negativas foram as mais tolerantes aos vinagres. O vinagre que maior inibição causou em *C. sakazakii* e *S. Typhimurium* foi o processado com framboesas, o qual induziu halos de 17,33 mm e 13,50 mm, respetivamente. No que diz respeito a *E. coli*, os vinagres que maior inibição causaram foram os de gengibre ( $27,33\pm 0,58$  mm) e framboesa ( $24,83\pm 3,87$  mm) ( $p>0,05$ ). *P. aeruginosa* foi a espécie Gram-negativa que apresentou a maior sensibilidade relativamente aos vinagres testados, apresentando valores de diâmetros de halos de inibição do seu crescimento de 28,40 mm, 30,00 mm, 39,00 mm, 32,20 mm, na presença dos vinagres de ameixa, cerveja, gengibre e framboesa, respetivamente. Todos os vinagres testados causaram inibições superiores às causadas pelos antibióticos (cloranfenicol e eritromicina) utilizados como controlos positivos no caso de *P. aeruginosa*.

A atividade antimicrobiana de vinagres também foi reportada por vários investigadores usando o método de difusão em agar. Num estudo realizado por Karaagac *et al.* (2016), a atividade antimicrobiana do vinagre de amora, produzido tradicionalmente, foi testada em *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Erwinia carotovora*, *E. coli* e *Candida albicans*. As duas bactérias Gram-positivas, *S. aureus* (28 mm) e *B. subtilis* (23,3 mm), foram as mais sensíveis ao vinagre de amora, enquanto *E. coli* (Gram-negativa) foi a mais tolerante (5,3 mm). No caso do presente estudo, também se observou que as espécies Gram-positivas como *S. aureus* foram mais sensíveis aos vinagres testados do que *E. coli*.

Hammouda *et al.* (2021) estudaram o efeito de diversos vinagres tradicionais da Tunísia (uva, figo, figo da Índia e tâmara) contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *L.*

*monocytogenes*, tendo obtido diâmetros de inibição que variaram de 10 - 23 mm, 15,5 - 24 mm, 11 - 17 mm e 14,5 - 17,5 mm, respetivamente. Neste trabalho não se observou que as Gram-negativas testadas fossem mais tolerantes aos vinagres do que as Gram-positivas.

Num outro estudo de Ozturk *et al.* (2015) vários microrganismos (*B. cereus*, *E. coli*, *E. coli* O157: H7, *Klebsiella pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*) mostraram sensibilidades variáveis em relação a vinagres produzidos de forma tradicional (uva, maçã, limão, alcachofra, romã, espinheiro) tendo sido medidos halos de inibição do crescimento num intervalo entre 6,18 - 23,56 mm. A espécie *B. cereus* foi inibida por todos os vinagres estudados, podendo observar-se que *E. coli* e *S. Typhimurium* apresentaram halos de inibição do crescimento inferiores a *B. cereus* (Ozturk *et al.*, 2015).

De acordo com Bakir *et al.* (2017) amostras de vinagre (maçã, uva, romã, balsâmico, amora, alcachofra, limão, rosa mosqueta, espinheiro, mirtilo, tâmara, amora, damasco e arroz) mostraram atividade antibacteriana contra *S. aureus* (9 - 13 mm), *S. Typhimurium* (9 - 16 mm) e *E. coli* (9 - 14 mm). Os valores dos halos de inibição do crescimento encontrados por estes autores foram, de uma forma geral inferiores, aos observados no presente trabalho. Resultados semelhantes também foram detetados por Kelebek *et al.* (2017), que investigou vinagres de maçã e uva em termos de atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (9 - 13,33 mm), *E. coli* (9,33 - 14,67 mm) e *P. aeruginosa* (11,83 - 15,50 mm).

Estes estudos mostraram que as atividades antimicrobianas das amostras de vinagre podem estar parcialmente relacionadas com os seus valores de pH, ácido acético e os compostos fenólicos (Sengun *et al.*, 2020).

### **3.3.2 Efeito dos Vinagres em Leveduras**

As tabelas 3.7 e 3.8 representam, respetivamente, o efeito dos antimicóticos e dos vinagres em leveduras.

Tabela 3.7 - Atividade antimicrobiana dos antimicóticos contra as leveduras (n=6)

Leveduras	Fluconazol	Anfotericina B	Nistatina
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	-	23,00±1,33 <sup>a</sup>	29,65±1,94 <sup>b</sup>
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	30,45±5,50 <sup>b</sup>	16,70±0,67 <sup>a</sup>	17,70±1,49 <sup>a</sup>
<i>C. neoformans</i> (YPO 186)	15,53±3,08 <sup>a</sup>	13,63±0,92 <sup>a</sup>	26,19±1,07 <sup>b</sup>
<i>S. cerevisiae</i> (PYCC 3507)	12,80±2,77 <sup>a</sup>	10,40±1,82 <sup>a</sup>	23,56±2,26 <sup>b</sup>
<i>P. membranifaciens</i> (PYCC 2489)	-	8,13±0,83 <sup>a</sup>	24,06±3,99 <sup>b</sup>
<i>Z. bailii</i> (PYCC 4806)	-	10,44±1,05 <sup>a</sup>	21,56±2,44 <sup>b</sup>
<i>D. hansenii</i> (PYCC 2968)	31,92±5,37 <sup>b</sup>	-	8,67±1,25 <sup>a</sup>

Os valores representam médias±desvios-padrão dos halos inibitórios e estão expressos em milímetros (mm); (-): ausência de halo. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p<0,05$ )

O fluconazol foi o antimicótico que mostrou ser mais eficaz contra *D. hansenii* (31,92±5,37 mm) - figura 3.13, e *C. albicans* (ATCC 90028) (30,45±5,50 mm), no entanto para *S. cerevisiae* (12,80±2,77 mm) - figura 3.14, apresentou halos inibitórios mais pequenos e não induziu a formação de halos em *C. albicans* (ATCC 10231), *P. membranifaciens* e *Z. bailii*.



Figura 3.13 - Efeito do fluconazol em *D. hansenii*



Figura 3.14 - Efeito do fluconazol em *S. cerevisiae*

A nistatina foi aquela que melhor conseguiu inibir *C. albicans* (ATCC 10231) ( $29,65 \pm 1,94$  mm) - figura 3.15, *C. neoformans* ( $26,19 \pm 1,07$  mm), *S. cerevisiae* ( $23,56 \pm 2,26$  mm), *P. membranifaciens* ( $24,06 \pm 3,99$  mm) e *Z. bailii* ( $21,56 \pm 2,44$  mm).

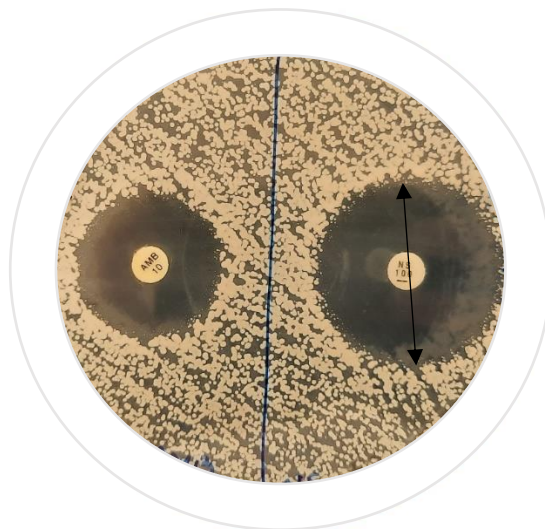


Figura 3.15 - Efeito da nistatina em *C. albicans* (ATCC 10231)

A anfotericina B foi o que obteve os menores halos para as leveduras, exceto para a *D. hansenii*, que não conseguiu inibir e, relativamente à nistatina, esta levedura apresentou-se como sendo a mais resistente ( $8,67 \pm 1,25$  mm) - figura 3.16.

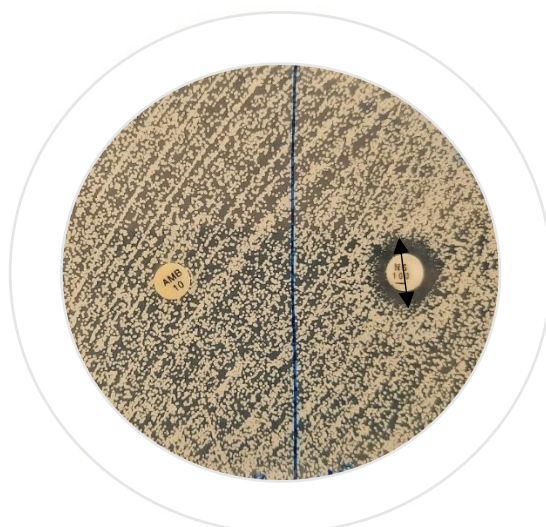


Figura 3.16 - Efeito da anfotericina B e nistatina em *D. hansenii*

No que toca à levedura *C. albicans* (ATCC 90028), a anfotericina B e a nistatina apresentaram, estatisticamente, um comportamento semelhante ( $p > 0,05$ ).

Já para *C. neoformans* e *S. cerevisiae*, o fluconazol e a anfotericina B mostraram ter um comportamento semelhante ( $p > 0,05$ ), contrariamente à nistatina que apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para estas leveduras.

Tabela 3.8 - Atividade antimicrobiana dos diferentes vinagres contra as leveduras (n=6)

Leveduras	Ameixa	Cerveja	Gengibre	Framboesa
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	8,67±1,03 <sup>a</sup>	8,50±1,38 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,67±0,58 <sup>a</sup>
<i>C. neoformans</i> (YPO 186)	9,33±0,58 <sup>a</sup>	9,00±1,00 <sup>a</sup>	11,67±0,58 <sup>b</sup>	11,00±1,00 <sup>a,b</sup>
<i>S. cerevisiae</i> (PYCC 3507)	-	-	-	-
<i>P. membranifaciens</i> (PYCC 2489)	7,67±0,58 <sup>a</sup>	7,67±0,58 <sup>a</sup>	-	-
<i>Z. bailii</i> (PYCC 4806)	-	-	-	-
<i>D. hansenii</i> (PYCC 2968)	12,33±1,37 <sup>a</sup>	12,33±1,03 <sup>a</sup>	13,67±0,58 <sup>a,b</sup>	15,00±1,00 <sup>b</sup>

Os valores representam médias±desvios-padrão dos halos inibitórios e estão expressos em milímetros (mm); (-): ausência de halo. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

A observação da tabela 3.8 permite afirmar que os vinagres estudados causaram níveis de inibição do crescimento das leveduras muito inferiores aos causados nas bactérias.

As leveduras testadas são mais tolerantes aos vinagres, do que as bactérias. Por exemplo, as espécies *C. albicans* (ATCC 10231), *S. cerevisiae*, *Z. bailii* não foram inibidas por nenhum dos vinagres, ou seja, são microrganismos resistentes aos vinagres estudados e a espécie *P. membranaifaciens* não foi inibida pelos vinagres de gengibre e framboesa. Os menores halos de inibição ( $7,67\pm 0,58$  mm) foram medidos nesta levedura na presença dos vinagres de ameixa e cerveja (figura 3.17), o que mostra que esta levedura é muito tolerante a este tipo de produtos.



Figura 3.17 - Efeito dos vinagres de ameixa e cerveja em *P. membranaifaciens*

No que diz respeito a *C. neoformans* os vinagres de gengibre e framboesa foram os mais inibitórios, não havendo diferenças significativas entre eles ( $p>0,05$ ) ( $11,67\pm 0,58$  mm e  $11,00\pm 1,00$  mm, respetivamente).

A levedura *D. hansenii* foi a mais sensível aos vinagres estudados, sendo o de framboesa o que induziu maior ação inibitória ( $15,00\pm 1,00$  mm) - figura 3.18. O mesmo se verificou para *C. albicans* (ATCC 90028) que foi a mais sensível para o vinagre de framboesa ( $9,67\pm 0,58$  mm) - figura 3.19.



Figura 3.18 - Efeito do vinagre de framboesa em *D. hansenii*

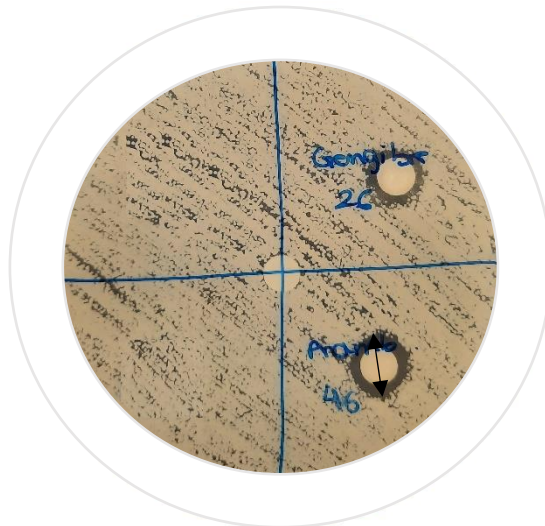


Figura 3.19 - Efeito do vinagre de framboesa em *C. albicans* (ATCC 90028)

Relativamente ao estudo de Karaagac *et al.* (2016), a atividade antifúngica do vinagre de amora foi testada apenas em *C. albicans* (ATCC 10231) e, tal como no presente trabalho, esta estirpe mostrou ser pouco tolerante ao vinagre, formando um halo de inibição de 9,6 mm.

No estudo de Hammouda *et al.* (2021), a atividade antifúngica de amostras tradicionais de vinagre (uva, figo, figo da Índia e tâmara) foi avaliada contra seis fungos filamentosos (*Fusarium equiseti*, *Trichothecium roseum*, *Nothophoma quercina*, *Penicillium sumatraense*, *Paecilomyces variotii* e *Alternaria alternate*) e os resultados mostraram que

apenas os vinagres de figo e de figo da Índia foram capazes de inibir o crescimento das espécies *F. equiseti* (figo =  $14 \pm 2,1$  mm; figo da Índia =  $12 \pm 0,00$  mm) e *T. roseum* (figo =  $11 \pm 0,71$  mm; figo da Índia =  $12 \pm 0,5$  mm), verificando-se que o efeito inibitório mais forte foi observado contra *F. equiseti* pelo vinagre de figo. Os autores relataram que estes resultados poderiam dever-se ao maior conteúdo fenólico total para os vinagres de figo, em comparação com os de uva e tâmara. No presente estudo não foi possível verificar essa relação.

Relativamente ao estudo de Ousaaid *et al.* (2021), a atividade antifúngica de diferentes vinagres de maçã (“red delicious”, “golden delicious”, “royal gala” e outras variedades) foi observada em duas leveduras *C. albicans* e *Candida tropicalis*. A amostra de vinagre “red delicious” foi a que mais inibiu *C. albicans* e *C. tropicalis*, com diâmetros de inibição entre  $12 \pm 0,5$  mm e  $11 \pm 0,7$  mm, respetivamente, enquanto que as restantes amostras não mostraram ter efeito inibitório contra estas leveduras. De um modo geral, neste estudo também se observou que as leveduras testadas mostraram ser mais tolerantes aos vinagres do que as bactérias. A atividade antimicrobiana é, certamente, influenciada pela presença de ácidos orgânicos fracos, em especial, o ácido acético.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO

As características de produtos acetificados (vinagres) obtidos a partir de frutos fermentados (ameixa e framboesa), cerveja e gengibre, foram estudadas com base na determinação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Os resultados obtidos permitem tecer algumas considerações finais e conclusões.

No que se refere aos parâmetros físico-químicos, o vinagre de framboesa apresenta o maior pH, a maior acidez, bem como o maior teor de compostos flavonoides e atividade antioxidante. Em contrapartida, os vinagres de gengibre e cerveja apresentam os menores valores relativamente a essas duas propriedades bioativas, destacando-se os mesmos, no parâmetro compostos fenólicos, pelo seu teor menos e mais elevado, respetivamente.

Verificou-se que, em relação ao parâmetro da cor, nomeadamente em relação às coordenadas  $a^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$ , os vinagres de framboesa e gengibre evidenciaram valores muito diferentes, sendo que para o primeiro foram alcançados os valores mais altos e para o segundo os valores mais baixos. No parâmetro relativo ao ângulo de tonalidade, os resultados alcançados foram opostos.

Já no que se refere aos vinagres de cerveja e ameixa, o primeiro apresenta o menor pH e o maior teor de compostos fenólicos, sendo que o segundo se destaca pela menor acidez, menor  $^{\circ}$ Brix e maior  $L^*$ , sendo que esta coordenada apresenta o valor mais baixo no vinagre de framboesa.

Relativamente aos parâmetros microbiológicos, verificou-se que as amostras de todos os vinagres em estudo, nomeadamente aos parâmetros associados à qualidade do produto, apresentaram valores abaixo de 1 UFC/ml, evidenciando uma excelente qualidade microbiológica o que se explica pelo facto de os vinagres terem sido submetidos, durante o seu processamento, a diversas operações tecnológicas de diminuição da carga microbiana, tais como a filtração e a pasteurização.

Adicionalmente, concluiu-se que os vinagres estudados apresentaram, de uma forma geral, uma capacidade de inibição do crescimento das bactérias, superior à revelada nas leveduras.

As bactérias Gram-negativas apresentaram-se mais tolerantes aos vinagres, com exceção de *Pseudomonas aeruginosa*. Já as espécies *Cronobacter sakazakii* e *Salmonella Typhimurium* foram aquelas em que os halos de inibição do crescimento medidos, foram mais pequenos, seguidas da espécie *Escherichia coli*. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi a espécie Gram-negativa que apresentou uma sensibilidade maior a todos os vinagres, constatando-se que essa sensibilidade foi superior à manifestada em relação aos antibióticos testados, nomeadamente ao cloranfenicol e à eritromicina.

As bactérias Gram-positivas estudadas foram as que revelaram maior sensibilidade aos vinagres, contudo, *Bacillus cereus* foi a menos sensível de todas as Gram-positivas.

O crescimento das leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii* não foi inibido pelos vinagres estudados, porém o crescimento da espécie *Pichia membranifaciens* foi inibido apenas na presença dos vinagres de gengibre e framboesa. Das leveduras usadas neste estudo, a que manifestou maior sensibilidade aos vinagres testados foi *Debaryomyces hansenii*.

Relativamente ao cumprimento dos parâmetros legais estabelecidos, nomeadamente no que se refere à acidez total, todas as amostras de vinagres estudadas apresentaram valores em conformidade.

## **5 PERSPETIVAS DE TRABALHOS FUTUROS**

Considera-se de manifesto interesse dar continuidade a estudos que permitam conhecer melhor as diferentes variedades de vinagres produzidos no Algarve, aprofundando alguns aspetos tais como:

- Caracterizar os ácidos orgânicos, assim como os compostos fenólicos existentes nos vinagres;
- Acompanhar os processos de fermentação alcoólica e acetificação que dão origem aos vários vinagres, através da determinação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos;
- Estudar os subprodutos do processamento do vinagre, com vista a melhor conhecer as suas propriedades e possíveis aplicações/utilizações.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquarone, E., Schmidell, W., Lima, U. de A., e Borzani, W. (2001). Biotecnologia na Produção de Alimentos. In E. Blücher (Ed.), *Biotecnologia Industrial* (1st ed., pp. 183–207). [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=eid=PP6uDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Aquarone+E,+Lima+UA,+Borzani+W,+Schmidell+W+\(2001\).eots=QjJmxJqq12&sig=2BUvBgM7xN-2TrYWL-mzVG65ybMerendir\\_esc=y#v=onepage&qef=false](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=eid=PP6uDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Aquarone+E,+Lima+UA,+Borzani+W,+Schmidell+W+(2001).eots=QjJmxJqq12&sig=2BUvBgM7xN-2TrYWL-mzVG65ybMerendir_esc=y#v=onepage&qef=false)
- Antimicrobial susceptibility testing, Método de difusão em disco descrito pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2000). Consultado em 16 de maio, 2020 através de <http://www.eucast.org>
- Bakir, S., Devecioglu, D., Kayacan, S., Toydemir, G., Karbancioglu-Guler, F., e Capanoglu, E. (2017). Investigating the antioxidant and antimicrobial activities of different vinegars. *European Food Research and Technology*, 243(12), 2083–2094. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2908-0>
- Bourgeois, J. F., e Barja, F. (2009). The history of vinegar and of its acetification systems. *Archives Des Sciences*, 62(2), 147–160.
- Budak, N. H., Aykin, E., Seydim, A. C., Greene, A. K., e Guzel-Seydim, Z. B. (2014). Functional Properties of Vinegar. *Journal of Food Science*, 79(5). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12434>
- Coelho, E., Genisheva, Z., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., e Domingues, L. (2017). Vinegar production from fruit concentrates: effect on volatile composition and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 4112–4122. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2783-5>
- Costa, V. C. (2014). Análise do processo de fabrico de vinagres [Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa] *Repositório Institucional da Universidade de Lisboa*. <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/8574>
- Cruz, M. A. M. (2012). Vinagres comercializados em Portugal: avaliação da capacidade antioxidante e da composição fenólica [Tese de Mestrado, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu]. *Repositório Científico do Instituto Politécnico de Viseu*
- Dabija, A., e Hatnean, C. A. (2014). Study concerning the quality of apple vinegar obtained through classical method. January 2014. [https://www.researchgate.net/profile/Adriana-Dabija/publication/326560354\\_Study\\_concerning\\_the\\_quality\\_of\\_apple\\_vinegar\\_obtained\\_through\\_classical\\_method/links/5b5623ad45851507a7c3fbb5/Study-concerning-the-quality-of-apple-vinegar-obtained-through-classic](https://www.researchgate.net/profile/Adriana-Dabija/publication/326560354_Study_concerning_the_quality_of_apple_vinegar_obtained_through_classical_method/links/5b5623ad45851507a7c3fbb5/Study-concerning-the-quality-of-apple-vinegar-obtained-through-classic)
- Dávalos, A., Bartolomé, B., e Gómez-Cordovés, C. (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry*, 93(2), 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.030>
- Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio. Diário da República, 1ª série, Nº 88, P: 2995-2997

- Desai, M. A., Kurve, V., Smith, B. S., Campano, S. G., Soni, K., e Schilling, M. W. (2014). Utilization of buffered vinegar to increase the shelf life of chicken retail cuts packaged in carbon dioxide. *Poultry Science*, 93(7), 1850–1854. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03793>
- El Sheikha, A. F., Zaki, M. S., Bakr, A. A., El Habashy, M. M., & Montet, D. (2010). Biochemical and sensory quality of physalis (*Physalis pubescens* L.) juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(3), 541–555. <https://doi.org/10.1051/fruits/2010021>
- Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., e Spinosa, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2). <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>
- Hammouda, M. Ben, Mahfoudhi, A., Gharsallah, H., Hatmi, H. El, Attia, H., e Azabou, S. (2021). Traditional homemade Tunisian vinegars: Phytochemical profile, biological, physicochemical and microbiological properties. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112293>
- Henriques, A. F. F. (2014). Análise de um Processo Fermentativo para Desenvolvimento de um Produto Alimentar [Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Tomar]. *Repositórios Científicos de Acesso Aberto de Portugal*
- Ho, C. W., Lazim, A. M., Fazry, S., Zaki, U. K. H. H., e Lim, S. J. (2017). Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. *Food Chemistry*, 221, 1621–1630. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.128>
- Hutchinson, U. F., Jolly, N. P., Chidi, B. S., Ngongang, M. M., e Ntwampe, S. K. O. (2019). Vinegar Engineering: a Bioprocess Perspective. *Food Engineering Reviews*, 11(4), 290–305. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09196-x>
- Hutkins, R. W. (2018). *Microbiology and technology of fermented foods* (2nd ed.). Wiley Blackwell.
- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Tabela da Composição de Alimentos. Consultado em 14 de setembro, 2020 através de <http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?21017>
- ISO 15214 (British Standard) (ISO, 1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs -Horizontal methods for enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count at 30 °C.
- ISO 21527-2 (ISO, 2008). Microbiology - General guidance for enumeration of yeasts and molds. Colony count technique at 25 °C.
- ISO 4833-1 (ISO, 2013). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for enumeration of microorganisms - Colony-count at 30 °C.
- Johnston, C. S., e Gaas, C. A. (2006). Vinegar: Medicinal uses and antiglycemic effect. In *MedGenMed Medscape General Medicine* (Vol. 8, Issue 2, p. 61). WebMD/Medscape Health Network. [/pmc/articles/PMC1785201/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1785201/)
- Karaagac, R. A., Aydogan, M. N., e Koseoglu, M. S. (2016). An investigation on antimicrobial and antioxidant activities of naturally produced mulberry vinegar. *Journal of Pharmaceutical Biology*, 6(March), 34–39.

- Kelebek, H., Kadiroğlu, P., Demircan, N. B., e Selli, S. (2017). Screening of bioactive components in grape and apple vinegars: Antioxidant and antimicrobial potential. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(3), 407–416. <https://doi.org/10.1002/jib.432>
- Kim, D. H., Chon, J. W., Kim, H., e Seo, K. H. (2019). Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid bacteria from various foods. *Food Control*, 106(March), 106717. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106717>
- Li, S., Li, P., Feng, F., e Luo, L. (2015). Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process. 4997–5024. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6659-1>
- Makhdoumi, P., Naghshbandi, M., Ghaderzadeh, K., Mirzabeigi, M., Yazdanbakhsh, A., e Hossini, H. (2021). Micro-plastic occurrence in bottled vinegar: Qualification, quantification and human risk exposure. *Process Safety and Environmental Protection*, 152, 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.06.022>
- Marques, F. P. P., Spinosa, W., Fernandes, K. F., Castro, C. F. de S., e Caliari, M. (2010). Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(SUPPL. 1), 119–126. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500019>
- Milanović, V., Osimani, A., Garofalo, C., De Filippis, F., Ercolini, D., Cardinali, F., Taccari, M., Aquilanti, L., e Clementi, F. (2018). Profiling white wine seed vinegar bacterial diversity through viable counting, metagenomic sequencing and PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, 286(April), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.022>
- NP 785 de 1985. Derivados de frutos agrícolas e de produtos hortícolas. Determinação do resíduo seco solúvel. Processo corrente. Instituto Português da Qualidade. Lisboa
- Ousaaid, D., Laaroussi, H., Bakour, M., Ennaji, H., Lyoussi, B., e El Arabi, I. (2021). Antifungal and Antibacterial Activities of Apple Vinegar of Different Cultivars. *International Journal of Microbiology*, 2021, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2021/6087671>
- Ozturk, I., Caliskan, O., Tornuk, F., Ozcan, N., Yalcin, H., Baslar, M., e Sagdic, O. (2015). Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *Lwt*, 63(1), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.003>
- Pazuch, C. M., Siepman, F. B., Canan, C., e Colla, E. (2015). Vinegar: functional aspects. *Científica*, 43(4), 302. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2015v43n4p302-308>
- Prodanov, M. P., Aznar, M., Cabellos, J. M., Vacas, V., López, F., Hernández, M. T., e Estrella, M. I. (2019). Tangential-flow membrane clarification of Malvar (*Vitis vinifera* L.) wine: incidence on chemical composition and sensorial expression. *OENO One*, 53(4), 741–755. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2019.53.4.2480>

- Quintana, L., Castro, R., e Guerrero, E. (2021). Biotechnological Processes in Fruit Vinegar Production. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 23. <https://doi.org/10.3390/foods10050945>
- Rodrigues, K. C. S., Sonogo, J. L. S., Cruz, A. J. G., Bernardo, A., e Badino, A. C. (2018). Modeling and simulation of continuous extractive fermentation with CO<sub>2</sub> stripping for bioethanol production. *Chemical Engineering Research and Design*, 132, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.12.024>
- Samad, A., Azlan, A., e Ismail, A. (2016). Therapeutic effects of vinegar: a review. *Current Opinion in Food Science*, 8, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.03.001>
- Sengun, I. Y. (2013). Microbiological and chemical properties of fig vinegar produced in Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 7(20), 2332–2338. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.2275>
- Sengun, I. Y., Kilic, G., e Ozturk, B. (2020). Screening physicochemical, microbiological and bioactive properties of fruit vinegars produced from various raw materials. *Food Science and Biotechnology*, 29(3), 401–408. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00678-6>
- Shah, N. N., e Singhal, R. S. (2017). Fermented Fruits and Vegetables. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 45–89). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00003-0>
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, 299, 152-178. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Solieri, L., e Giudici, P. (Eds.). (2009). Vinegars of the World. *Springer*.
- Suman, P. A. (2012). Processo De Obtenção De Vinagre De Gengibre [Tese de Mestrado]. *Repositório Institucional UNESP* [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/90532/suman\\_pa\\_me\\_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/90532/suman_pa_me_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Tan, S. C. (2005). Vinegar Fermentation [Faculty of the Louisiana State University]. <https://doi.org/10.1002/9780470277515.ch11>
- Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., e Troncoso, A. M. (2002). Wine vinegar: Technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 13(1), 12–21. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00023-7)
- Torija, M. J., Mateo, E., Guillamón, J. M., e Mas, A. (2010). Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology*, 27(2), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.10.001>
- United States Department of Agriculture, (USDA). National Nutrient Database for Standard Reference. Consultado em 14 de setembro, 2020 através de <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1102778/nutrients>
- Veloso, C. L. (2013). Sistema de produção de vinagre. *Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (SBRT)*. <http://respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Mjc2Nzc=>

Wang, Z., Li, T., Liu, F., Zhang, C., Ma, H., Wang, L., e Zhao, S. (2017). Effects of ultrasonic treatment on the maturation of Zhenjiang vinegar. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39 (February), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.04.020>

Zhishen, J., Mengcheng, T., e Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)