

VERA CAROLINA COELHO SOARES

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E ANTIOXIDANTES DE
VINAGRES DE FRUTOS



2022

VERA CAROLINA COELHO SOARES

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E ANTIOXIDANTES DE
VINAGRES DE FRUTOS

Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Célia Quintas

Professora Doutora Patrícia Nunes



2022

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E ANTIOXIDANTES DE VINAGRES DE FRUTOS

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 Vera Carolina Coelho Soares, 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

Ao longo desta etapa foram vários os obstáculos que surgiram, mas felizmente tive do meu lado pessoas incríveis que me deram sempre a mão. Gostaria de agradecer a todos os que de algum modo contribuíram para a realização desta tese.

Em especial, às minhas orientadoras, Professora Doutora Célia Maria Brito Quintas e Professora Doutora Patrícia Alexandra Reis Nunes, por me terem proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho experimental e pela disponibilidade, dedicação, motivação constante, partilha de conhecimento, apoio, amizade e palavras de conforto transmitidos ao longo desta caminhada.

Ao Professor Doutor Eduardo Esteves, pela colaboração na análise estatística dos dados envolvidos neste trabalho experimental e pelo apoio e disponibilidade demonstrados.

Às Engenheiras Neusa Rodrigues, Clárisse Ramalho e Vera Gonçalves pela preciosa ajuda, partilha de saberes e disponibilidade na realização de todas as etapas laboratoriais.

À minha colega Beatriz, que me ajudou muito durante todo este processo. Agradeço por toda a paciência, ajuda, companheirismo e amizade.

Ao meu querido namorado David por todo o carinho, apoio incondicional, força e compreensão nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos amigos Joana e Marco, que me acompanharam ao longo desta jornada. Obrigada pela amizade, boa disposição e incentivo.

Aos meus pais, que me apoiaram em todas as minhas decisões e me deram força para nunca desistir. Obrigada por todo o carinho, sem eles nada disto teria sido possível.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de vinagres obtidos a partir de frutos fermentados de damasco e malagueta, através da avaliação de parâmetros microbiológicos e físico-químicos. Os vinagres foram processados (Método de Orleans) e engarrafados no Algarve. O vinagre de damasco apresentou valores de pH, acidez total, °Brix e concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais de $3,23 \pm 0,01$; $7,33 \pm 0,05$ g/100 ml de ácido acético; $5,13 \pm 0,12$; $0,15 \pm 0,15$ mg de ácido gálico/100 ml e $52,79 \pm 3,00$ mg catequina/100 ml, respetivamente. Para o vinagre de malagueta obtiveram-se valores de pH, acidez total, °Brix e concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais de $2,71 \pm 0,01$; $6,09 \pm 0,15$ g/100 ml de ácido acético; $5,10 \pm 0,00$; $0,34 \pm 0,16$ mg de ácido gálico/100 ml e $34,34 \pm 2,34$ mg catequina/100 ml, respetivamente. O poder antioxidante do vinagre de damasco foi superior ($0,34 \pm 0,01$ DPPH, mg de Trolox/100 ml) ao detetado no vinagre de malagueta ($0,02 \pm 0,01$ DPPH, mg de Trolox/100 ml). Realizou-se uma avaliação da qualidade microbiológica, através da contagem de bactérias acéticas, bactérias ácido-láticas, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos aeróbios. Utilizando o método de difusão em agar procedeu-se ao estudo da atividade antimicrobiana dos vinagres contra diversas bactérias e leveduras. Ambos os vinagres apresentaram contagens de microrganismos inferiores a 1 UFC/ml, o que confirma a sua qualidade microbiológica. Estes produtos demonstraram uma capacidade de inibição do crescimento das leveduras inferior à detetada nos antimicóticos testados e revelaram uma atividade antibacteriana superior à atividade antifúngica. As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ($36,06 \pm 3,10$ - $40,17 \pm 2,72$ mm), *Escherichia coli* ($30,89 \pm 3,86$ - $32,00 \pm 1,6$ mm) e *Staphylococcus aureus* ($31,11 \pm 2,41$ - $30,67 \pm 1,80$ mm) foram as mais sensíveis aos vinagres, pelo contrário *Salmonella Typhimurium* ($18,72 \pm 2,50$ - $23,39 \pm 2,48$ mm) foi a menos tolerante. O crescimento das leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens* e *Zygosaccharomyces bailii* não foi inibido pelos vinagres.

Palavras-chave: vinagre; parâmetros microbiológicos; parâmetros físico-químicos; atividade antimicrobiana; atividade antioxidante.

Abstract

The present work aimed to evaluate the antimicrobial and antioxidant potential of vinegar obtained from fermented apricot and chilli fruits, through the evaluation of microbiological and physicochemical parameters. The vinegars were processed (Orléans Method) and bottled in Algarve. The apricot vinegar presented values of pH, total acidity, °Brix and concentration of total phenolic compounds and total flavonoids of $3,23\pm 0,01$; $7,33\pm 0,05$ g/100 ml of acetic acid; $5,13\pm 0,12$; $0,15 \pm 0,15$ mg of gallic acid/100 ml and $52,79\pm 3,00$ mg catechin/100 ml, respectively. For chilli vinegar, pH, total acidity, °Brix and concentration of total phenolic compounds and total flavonoids were $2,71\pm 0,01$; $6,09\pm 0,15$ g/100 ml acetic acid; $5,10\pm 0,00$; $0,34\pm 0,16$ mg gallic acid/100 ml and $34,34\pm 2,34$ mg catechin/100 ml, respectively. The antioxidant power of apricot vinegar was higher ($0,34\pm 0,01$ DPPH, mg Trolox/100 ml) than that detected in chilli vinegar ($0,02\pm 0,01$ DPPH, mg Trolox/100 ml). An evaluation of microbiological quality was carried out by counting acetic bacteria, lactic acid bacteria, yeast, filamentous fungi and aerobic microorganisms. The antimicrobial activity of the vinegars against different bacteria and yeasts was studied using the agar diffusion method. Both kinds of vinegar showed microorganism counts lower than 1 CFU/ml, which confirms their microbiological quality. These products showed a lower capacity to inhibit yeast growth than the antimycotics tested and showed antibacterial activity higher than antifungal activity. The bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (36.06 ± 3.10 - 40.17 ± 2.72 mm), *Escherichia coli* (30.89 ± 3.86 - 32.00 ± 1.6 mm) and *Staphylococcus aureus* (31.11 ± 2.41 - 30.67 ± 1.80 mm) were the most sensitive to the vinegars. On the other hand, *Salmonella* Typhimurium (18.72 ± 2.50 - 23.39 ± 2.48 mm) was the least tolerant. The growth of the yeasts *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens* and *Zygosaccharomyces bailli* was not inhibited by the vinegar.

Keywords: vinegar; microbiological parameters; physicochemical parameters; antimicrobial activity; antioxidant activity.

Índice Geral

Declaração de Autoria de Trabalho	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract.....	vi
Índice Geral	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xiii
1 - Introdução	1
1.1 - Aplicações e Tendências de Mercado do Vinagre.....	1
1.2 - Legislação e Qualidade do Vinagre	3
1.3 - Compostos Funcionais dos Vinagres e Propriedades Benéficas	7
1.3.1 - Nutrientes	8
1.3.2 – Formação de Compostos Bioativos no Processo de Produção do Vinagre .	10
1.4 - Matérias-primas	12
1.4.1 - Frutos Fermentados	12
1.4.2 - Pré-tratamentos das Matérias-primas para Produção de Vinagre	14
1.5 - Processos Bioquímicos Envolvidos na Produção de Vinagre	16
1.5.1 - Fermentação Alcoólica.....	17
1.5.2 - Acetificação.....	19
1.6 - Tecnologias de Produção de Vinagre	23
1.6.1- Processo Lento, de Orleans, Francês ou em Superfície	24
1.6.2 - Processo Rápido ou Alemão	25
1.6.3 - Processo Submerso.....	27
1.7 - Processos de Finalização do Vinagre	28

1.8 - Avanços Tecnológicos na Produção de Vinagre através de Biocatalisadores Imobilizados.....	30
1.8.1 - Células Imobilizadas	30
1.9 - Objetivos.....	33
2 - Material e Métodos	33
2.1 - Amostragem.....	33
2.2 - Parâmetros Físico-químicos.....	33
2.2.1 - Determinação da Densidade.....	33
2.2.2 - Determinação da Acidez Total.....	34
2.2.3 - Determinação do pH.....	35
2.2.4 - Determinação da Cor.....	35
2.2.5 - Determinação do Resíduo Seco Solúvel (°Brix)	36
2.2.6 - Determinação dos Compostos Fenólicos Totais	36
2.2.7 - Determinação dos Compostos Flavonoides Totais	37
2.2.8 - Determinação da Atividade Antioxidante	37
2.3 - Parâmetros Microbiológicos.....	38
2.3.1 - Avaliação da Qualidade Microbiológica.....	38
2.3.2 - Avaliação da Atividade Antimicrobiana	41
2.4 - Estudo Estatístico.....	43
3 - Resultados e Discussão	44
3.1 - Parâmetros Físico-químicos.....	44
3.1.1 - Propriedades Físico-químicas	44
3.1.2 - Propriedades Bioativas.....	48
3.2 - Avaliação da Qualidade Microbiológica dos Vinagres	50
3.3 - Estudo da Atividade Antimicrobiana.....	52
3.3.2- Atividade Antifúngica.....	62
4 - Conclusão.....	70

5 -	Perspetiva de Trabalhos Futuros	71
6 -	Referências Bibliográficas	72

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Balança comercial de vinagre em Portugal de 2012 a 2020. Adaptado de INE (2013,2014,2015,2016,2017,2018,2020).	3
Figura 1.2 - Mecanismo de ação dos vinagres contra bactérias patogénicas. Adaptado de Ousaaïd <i>et al.</i> (2022).	11
Figura 1.3 - Pré-tratamentos das diferentes matérias-primas utilizadas na produção de vinagres. Adaptado de Bekatorou (2020).	14
Figura 1.4 - Esquema dos processos fermentativos que ocorrem durante o processamento de vinagre. Adaptado de Bekatorou (2020).	17
Figura 1.5 - Representação esquemática do processo de acetificação e estratégias moleculares que conferem às bactérias do género <i>Acetobacter</i> e <i>Gluconacetobacter</i> resistência ao ácido acético. AIDH (enzima álcool desidrogenase); AcDH (enzima acetaldeído desidrogenase); AarC (gene que codifica a coenzima A transferase); AarA (gene que codifica a enzima citrato sintase); CS (citrato sintase); ACN (aconitase). Adaptado de Hutkins (2019); Matsushita <i>et al.</i> (2016); Saichana <i>et al.</i> (2015).	22
Figura 1.6 - Comparação entre métodos gerais de produção de vinagre (tradicional e industrial). Adaptado de Perestrelo <i>et al.</i> (2018).	24
Figura 1.7 - Recipiente utilizado para a elaboração de vinagre pelo processo de Orleans. Adaptado de Veloso (2013).	25
Figura 1.8 - Acetificador utilizado no processo rápido para a produção de vinagre. Adaptado de Aquarone <i>et al.</i> (2001).	26
Figura 1.9 - Corte transversal de um acetificador para produção de vinagre pelo método de acetificação em cultura submersa: a) turbina de ar, b) compensador de ar, c) dispositivo para recolher líquido da 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 substrato alcoólico; k) bomba para recolha do vinagre. Adaptado de Veloso (2013).	28
Figura 1.10 - Representação esquemática dos tipos de imobilização celular. Adaptado de Bekatorou (2020).	31
Figura 1.11 - Diagrama de produção de vinagre de cana-de-açúcar utilizando bactérias <i>A. aceti</i> imobilizadas por adsorção em aparas de madeira. Adaptado de Bekatorou (2020).	32

Figura 2.1 - Escalas de cor. A: Esquema de espaço cor CIE Lab. Adaptado de x-rite Pantone, (2016) e Konica Minolta, (2022); B: Esquema de espaço cor Hunter Lab. Adaptado de HunterLab, (1996).	36
Figura 3.1 - Efeito da ampicilina em <i>S. aureus</i> (A) e <i>E. coli</i> (B).	54
Figura 3.2 - Efeito da penicilina em <i>L. innocua</i> (A) e <i>P.aeruginosa</i> (B).	54
Figura 3.3 - Efeito do cloranfenicol em <i>S. epidermidis</i> (A) e <i>P. aeruginosa</i> (B).	55
Figura 3.4 - Efeito da eritromicina em <i>B. cereus</i> (A) e <i>S. Typhimurium</i> (B).	55
Figura 3.5 - Efeito do vinagre de damasco em <i>P. aeruginosa</i> (A) e <i>B. cereus</i> (B).	57
Figura 3.6 - Efeito do vinagre de damasco em <i>P. aeruginosa</i> (A) e <i>S. Typhimurium</i> (B).	58
Figura 3.7 - Efeito da nistatina em <i>C. albicans</i> (ATCC 10231) (A) e <i>D. hansenii</i> (B).	64
Figura 3.8 - Efeito da anfotericina B em <i>C. albicans</i> (ATCC 10231) (A) e <i>Z. bailii</i> (B).	65
Figura 3.9 - Efeito do fluconazol em <i>D. hansenii</i> (A) e <i>C. neoformans</i> (B).	65
Figura 3.10 - Efeito do vinagre de damasco em <i>D. hansenii</i> (A) e <i>C. albicans</i> (ATCC 90028) (B).	67
Figura 3.11 - Efeito do vinagre de malagueta em <i>C. neoformans</i> (A) e <i>C. albicans</i> (ATCC 90028) (B).	67

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Principais características dos vinagres de acordo com o Decreto-Lei n.º 174/2007 de 8 de Maio.	4
Tabela 1.2 - Ingredientes facultativos permitidos e substâncias proibidas na preparação de vinagre.	6
Tabela 1.3 - Composição nutricional do vinagre por 100 gramas de acordo o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge- INSA (INSA, 2022).	10
Tabela 2.1 - Composição do meio de cultura BAA.	39
Tabela 2.2 - Microrganismos utilizados para o estudo da atividade antimicrobiana dos vinagres de damasco e malagueta.	42
Tabela 2.3 - Antibióticos e antimicóticos testados para os microrganismos em estudo.	43
Tabela 3.1 - Propriedades físico-químicas das amostras de vinagre de damasco e malagueta.	44
Tabela 3.2 - Parâmetro de cor das amostras de vinagre de damasco e malagueta.	46
Tabela 3.3 - Propriedades bioativas dos diferentes vinagres.	48
Tabela 3.4 - Atividade antimicrobiana dos antibióticos contra as bactérias testadas.	53
Tabela 3.5 - Atividade antimicrobiana dos vinagres contra as bactérias testadas.	56
Tabela 3.6 - Atividade antimicrobiana dos antimicóticos contra as leveduras testadas.	63
Tabela 3.7 - Atividade antimicrobiana dos vinagres contra as leveduras testadas.	66

Lista de Siglas e Abreviaturas

a*	Coordenada do parâmetro cor: tonalidade
a.C	Antes de Cristo
ABC	ATP Binding Cassete
Abs	Absorvância
AcDH	Acetaldeído desidrogenase
AIDH	Álcool desidrogenase
ATP	Adenosina trifosfato
b*	Coordenada do parâmetro cor: intensidade ou pureza
BA	Bactérias acéticas
BAA	Acid Acetic Bacteria Medium
C*	Coordenada do parâmetro cor: cromaticidade
CAGR	Compound Annual Groth Rate
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazilo
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol
h°	Coordenada do parâmetro cor: ângulo Hue (ângulo de tonalidade)
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISO	International Organization for Standardization
L*	Coordenada do parâmetro cor: luminosidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MEA	Malt Extract Agar
MH	Mueller-Hinton
MRS	Man, Rogosa and Sharpe Agar
mt	Megatoneladas
N°	Número
NP	Norma Portuguesa
PCA	Plate Count Agar
PET	Tereftalato de polietileno
UFC	Unidade formadora de colónias
YM	Yeast Mold Agar

1 - Introdução

A palavra “vinagre” tem origem na palavra francesa “vinaigre”, que significa “vinho azedo”, a qual deriva do termo latim “*Vinum acre*” ou “*Vinum acetum*”. Como tal, o surgimento do vinagre está associado ao vinho, uma vez que constitui um subproduto resultante da sua acidificação, quando exposto ao ar, apresentando um cheiro e sabor característicos (Bourgeois & Barja, 2009).

O vinagre é definido como um produto obtido através de um processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, a partir de qualquer fonte de hidratos de carbono fermentáveis, como por exemplo, frutos, hortícolas, cereais, mel e vinho (APN, 2017). O seu consumo apresenta vários benefícios para a saúde, graças às suas propriedades funcionais e medicinais, que incluem, sobretudo, a atividade antibacteriana e atividade antioxidante (Budak *et al.*, 2014).

1.1 - Aplicações e Tendências de Mercado do Vinagre

O vinagre tem vindo a ser produzido desde a antiguidade, sendo que a sua primeira utilização ocorreu há cerca de 3000 anos a.C. pelos Babilónios, que já tinham conhecimento das suas propriedades, aplicando-o como um conservante de alimentos e enaltecedor de sabor. Desde a era de Hipócrates que o vinagre tem sido utilizado como agente antimicrobiano para o tratamento de infeções e doenças. Resíduos deste produto também foram encontrados em urnas egípcias que datam de aproximadamente 3000 anos a.C. Em 1864, Louis Pasteur demonstrou que o vinagre resulta de um processo natural de fermentação (APN, 2017; Bourgeois & Barja, 2009; Hailu *et al.*, 2012).

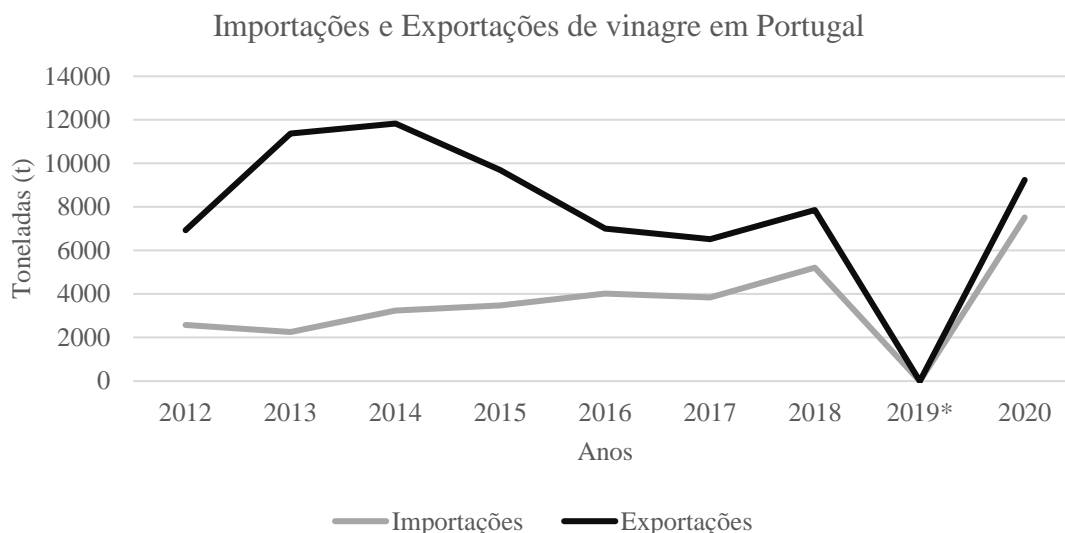
De forma geral, os vinagres apresentam propriedades diversas de conservação, condimentação, aromatização, antimicrobianas e medicinais. Além de poderem ser consumidos diretamente, estes são aplicados na produção de diferentes géneros alimentícios, fazendo parte de alguns condimentos, que incluem a mostarda, o *ketchup* e a maionese. Outra opção é a produção de pickles de uma ampla gama de produtos, desde vegetais (por exemplo, alface, repolho, pepino, beterraba, cenoura), fruta (por exemplo, azeitona) e carnes (por exemplo, salsichas), constituindo um método de conservação, em que os alimentos são imersos em vinagre, com posterior adição de açúcar e/ ou sal para evitar a sua deterioração. A acidez do vinagre impede o crescimento microbiano e ao

mesmo tempo adiciona sabor e aroma aos produtos em conserva (Bekatorou, 2020; Ho *et al.*, 2017; Hailu *et al.*, 2012)

O facto de o vinagre possuir diversas aplicações faz com que este seja considerado um dos produtos alimentares com maior valor de mercado. Em 2017, a estimativa de valor de mercado global foi de 1,26 biliões de dólares. A taxa de crescimento anual composta (CAGR) entre 2010 e 2017 foi de 2,1%, de acordo com a informação disponibilizada pelo grupo IMARC (Bekatorou, 2020; Radiant Insights, Inc ,2018).

Segundo o Expert Market Reaserch (EMR), em 2020 a estimativa de valor de mercado global foi de 1,32 biliões de dólares e estima-se que a CAGR entre 2021 e 2026 seja de 1,6% (EMR, 2022). Em 2017, a Europa apresentou o maior consumo de vinagre, seguida da América do Norte, Ásia, América Latina, Médio Oriente e África (Bekatorou,2020). De acordo com o relatório do *Global Dressing Vinegar Market Analysis and Forecast*, em 2015 o mercado de vinagres correspondeu a: 36,710 mt para o vinagre balsâmico; 8,686 mt para o vinagre de sidra; 9,673 mt para o vinagre de vinho branco; 21,078 mt para o vinagre de vinho tinto; 4,901 mt para o vinagre de arroz; e 5,588 mt para o vinagre de malte. Até 2024, o mercado deverá atingir: 54,772 mt para o vinagre balsâmico; 13,427 mt para o vinagre de sidra; 14,297 mt para o vinagre de vinho branco; 31,720 mt para o vinagre de vinho tinto; 7,539 mt para o vinagre de arroz; e 8,541 mt para o vinagre de malte (Persistence Market Research, 2017).

Segundo Gonçalves (2017), entre 2016 e 2017, os consumidores portugueses gastaram cerca de 11,4 milhões de euros na compra de vinagres, notando-se uma procura crescente de produtos inovadores, fabricados a partir de matérias-primas diferentes das tradicionais, e com valor acrescentado. Contudo, apesar da diversidade de produtos, o vinagre de vinho branco continua a ser o mais consumido em Portugal (67%), seguido do vinagre de sidra. Na relação de Portugal com o exterior, verificou-se entre 2012 e 2020 um saldo comercial positivo, uma vez que as exportações superaram as importações (Figura 1.1).



(*) Não existem dados estatísticos referentes ao ano 2019.

Figura 1.1- Balança comercial de vinagre em Portugal de 2012 a 2020. Adaptado de INE (2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2020).

1.2 - Legislação e Qualidade do Vinagre

As normas a que deve obedecer o fabrico e a comercialização do vinagre são estabelecidas pela legislação portuguesa através do Decreto-Lei n.º 174/2007 de 8 de maio.

Segundo o presente Decreto-Lei, entende-se por vinagre “*o produto obtido exclusivamente pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de produtos de origem agrícola*”. Na Tabela 1.1 estão apresentadas as principais características dos vinagres comercializados em Portugal, conforme a legislação em vigor.

Tabela 1.1 - Principais características dos vinagres de acordo com o Decreto-Lei n.º 174/2007 de 8 de Maio.

Parâmetro	Vinagres de vinho	Outros Vinagres
Acidez total (g ácido acético /100 ml)	≥ 6 g/100 ml	≥ 5 g/100ml
Álcool residual (% (v/v), a 20 °C)	≤ 1,5 %	≤ 0,5 %
Aspetto	Límpido, podendo admitir-se ligeiro depósito ou turvação	-
Cor, aroma e sabor	Próprios da natureza da matéria-prima e dos ingredientes facultativos indicados no rótulo	

De acordo com este diploma legal nacional, os vinagres classificam-se em nove grupos quanto à sua origem:

- Vinagre de vinho: “*vinagre obtido exclusivamente do vinho pelo processo biológico de fermentação acética*”;
- Vinagre de fruta e vinagre de bagas: “*vinagre obtido da fruta ou bagas de fruta pelo processo biológico de fermentação alcoólica e acética*”;
- Vinagre de sidra: “*vinagre obtido da sidra pelo processo biológico de fermentação acética*”;
- Vinagre de álcool: “*vinagre obtido do álcool destilado de origem agrícola pelo processo biológico de fermentação acética*”;
- Vinagre de cereais: “*vinagre obtido, sem destilação intermédia, pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de cereais cujo amido tenha sido convertido em açúcares pela diastase de cevada maltada ou por qualquer outro processo*”;
- Vinagre de malte: “*vinagre obtido, sem destilação intermédia, pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de cevada maltada com ou sem a adição de cereais, cujo amido foi convertido em açúcares unicamente pelo processo da diastase de cevada maltada*”;

- Vinagre de malte destilado: “*vinagre obtido pela destilação do vinagre de malte, sob pressão reduzida, contendo apenas os constituintes voláteis do vinagre de malte de que deriva*”;
- Outros vinagres: “*vinagres de outros produtos de origem agrícola de dupla fermentação não contemplados nas alíneas anteriores, designadamente de mel, de cerveja, entre outros*”;
- Vinagres aromatizados e vinagres com especiarias: “*vinagres referidos nas alíneas anteriores aos quais sejam adicionadas plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes, que sejam organolepticamente perceptíveis*”.

A legislação também estabelece que para a obtenção de produtos acetificados só podem ser utilizadas matérias-primas que se encontrem em conveniente estado de conservação e que estejam isentas de substâncias ou matérias estranhas à sua normal composição, assim como de microrganismos patogénicos e substâncias em níveis suscetíveis de prejudicarem a saúde do consumidor (Artigo 3º do Decreto-Lei n.º 174/2007 de 8 de maio).

Durante a preparação de vinagre é permitida a adição de ingredientes facultativos e proibida a adição de determinadas substâncias, os quais se encontram enumerados na Tabela 1.2 conforme descrito nos artigos 4º e 5º do Decreto-Lei n.º 174/2007 de 8 de maio.

Tabela 1.2 - Ingredientes facultativos permitidos e substâncias proibidas na preparação de vinagre.

Ingredientes facultativos	Substâncias proibidas
Plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes	Aromatizantes artificiais
Sumos de fruta ou concentrados de sumo de fruta	Óleos de grainha de uva, naturais ou artificiais
Mel	Resíduos de destilação, resíduos de fermentação ou os seus subprodutos
Açúcar	Substâncias extraídas de bagaço de 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

De acordo com o Artigo 8º do Decreto-Lei n.º 174/2007 de 8 de maio são ainda admitidos durante o processo de fabrico de vinagres os agentes de filtração, clarificação e acabamento aprovados para os vinhos. No caso de ser necessária a multiplicação das bactérias acéticas é permitida a utilização de preparações de malte, amido líquido, glucose e substâncias inorgânicas, como os fosfatos e sais de amónio.

Segundo o Artigo 9º do Decreto-Lei n.º 174/2007 de 8 de maio relativamente ao fabrico, preparação e conservação dos vinagres são autorizadas diversas operações tecnológicas mencionadas nos seguintes pontos:

- Mistura de vinhos;
- Diluição dos produtos alcoólicos 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;
- Diluição dos vinagres com água potável;
- Coloração com caramelo;
- Esterilização e pasteurização.

Em relação ao acondicionamento de vinagres, a legislação portuguesa estabelece que este produto destinado ao consumidor final deve apresentar-se pré-embalado, podendo encontrar-se a granel quando se destine às indústrias, a grossistas e a outras entidades similares. Quanto ao material em contacto com o vinagre, este deve ser impermeável, inerte e inócuo em relação ao conteúdo e garantir uma adequada conservação (Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio).

1.3 - Compostos Funcionais dos Vinagres e Propriedades Benéficas

Os vinagres são produtos ricos em nutrientes e compostos bioativos, cuja concentração está dependente das matérias-primas utilizadas, tecnologias de processamento, reações químicas, mudanças físicas e tipos de fermentação aplicados durante o processo de produção. Estes compostos funcionais não só contribuem para definir os sabores e aromas dos vinagres, como desempenham um papel importante no tratamento e prevenção de algumas patologias, através das suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, efeitos anticolesterolemicos, anti-hipertensivo e implicações no metabolismo glicídico (Xia *et al.*, 2020).

O vinagre apresenta um papel importante na Indústria Alimentar, pois tem a capacidade de reduzir o pH dos alimentos (resultante da presença de ácido acético), impedindo o desenvolvimento de bactérias, prevenindo o crescimento de fungos, neutralizando alguns odores desagradáveis dos alimentos e “desinfetando” os equipamentos. No entanto, a atividade antibacteriana e antifúngica destes produtos pode ser condicionada por vários fatores, destacando-se as estirpes microbianas, concentração de ácido acético, pH e temperatura (Pazuch, *et al.*, 2015; Samad *et al.*, 2016). Assim, a atividade antimicrobiana dos vinagres permite a sua utilização na higienização dos alimentos, contribuindo para a inibição de alguns microrganismos e consequente diminuição da ocorrência de toxinfecções alimentares (APN, 2017).

Os antioxidantes consistem em substâncias produzidas pelos seres vivos (por exemplo, plantas) para combater radicais livres. Estes compostos também podem ser obtidos por meio da ingestão de produtos de origem sintética ou natural. Entre os antioxidantes naturais podem citar-se os tocoferóis, vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos (Silveira *et al.*, 2018). A atividade antioxidante dos vinagres está dependente da presença de vários compostos bioativos, que têm origem nas diversas frutas utilizadas como matéria-prima, podendo também ser influenciada pelas técnicas de processamento aplicadas (Bakir *et al.*, 2017). Este potencial antioxidante ajuda a reduzir o stress oxidativo e dessa forma contribui para a diminuição da incidência de doenças relacionadas com a presença de radicais livres, como é o caso de algumas doenças degenerativas (APN, 2017).

O vinagre também proporciona um efeito protetor sobre doenças cardiovasculares, uma vez que reduz o stress oxidativo e a oxidação do LDL, evitando o início ou progressão da aterosclerose (APN, 2017).

Segundo alguns estudos, o vinagre pode reduzir a pressão sanguínea, uma vez que este impede a atividade da enzima conversora da angiotensina no sistema de regulação da pressão arterial (APN, 2017).

O vinagre também potencia a redução dos valores de glicemia. No caso dos indivíduos diabéticos ou com resistência à insulina, os resultados apontam para melhorias na resposta insulínica em refeições com um índice glicémico mais elevado (APN, 2017).

1.3.1 - Nutrientes

Os constituintes nutricionais que fazem parte da composição dos vinagres incluem: aminoácidos, açúcares, vitaminas e microelementos. Estes compostos são responsáveis por manter o equilíbrio ácido-base, regular o metabolismo celular, fornecer energia e regular o sistema imunológico (Chou *et al.*, 2020).

Os aminoácidos são sobretudo provenientes das matérias-primas ou de proteínas de decomposição microbiana. Segundo os autores Xia *et al.* (2020), nos vinagres de frutas, um dos aminoácidos mais frequente é o ácido glutâmico. De acordo com um estudo efetuado por Chinnici, *et al.* (2015) foram detetados 24 aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em vinagres balsâmicos e vinagres de cereja. Os aminoácidos são nutrientes importantes na regulação do metabolismo celular e

contribuem para o desenvolvimento cerebral e manutenção do sistema imunológico. Alguns aminoácidos, como a histidina, metionina, cisteína, triptofano e tirosina possuem atividade antioxidante. Na etapa de fermentação acética para produção de vinagre é sintetizado um aminoácido não proteico, o ácido gama-aminobutírico (GABA), que promove a diurese, reduz os níveis lipídicos e a pressão arterial, possuindo ainda efeitos ansiolíticos (Koyama *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2020).

São vários os açúcares que podem estar presentes nos vinagres, como os monossacáridos que incluem a glucose, frutose, xilose e manose. A frutose e a glucose surgem sobretudo nos vinagres de fruta providenciando o respectivo sabor doce característico. Além disso, também podem estar presentes dissacáridos, como a sacarose e a maltose, e polissacáridos, que surgem em pequenas quantidades em alguns destes produtos. Estes açúcares apresentam vários benefícios para a saúde, devido às suas propriedades antioxidantes, anticoagulantes e imunorreguladoras (Koyama *et al.*, 2017; Pinu *et al.*, 2016).

As principais vitaminas que fazem parte da composição nutricional dos vinagres são a vitamina B e C. A niacina (vitamina B₃) potencia a vasodilatação dos vasos sanguíneos e desempenha um papel importante na excreção de colesterol. A vitamina C apresenta atividade antioxidante, uma vez que inibe a peroxidação lipídica e reduz o *stress* oxidativo (Ganji *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2008). Alguns dos minerais presentes nos vinagres estão mencionados na Tabela 1.3, onde está representada a respetiva composição nutricional do vinagre, de acordo com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge-INSA (INSA, 2022). Minerais como o zinco e o potássio são essenciais para manter o equilíbrio ácido-base do organismo e prevenir processos de acidificação do sangue. As vitaminas e minerais presentes nos vinagres asseguram necessidades nutricionais diárias, que são fundamentais para promover o crescimento e desenvolvimento e regular as funções fisiológicas (Xia *et al.*, 2020).

Tabela 1.3 - Composição nutricional do vinagre por 100 gramas de acordo o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge- INSA (INSA, 2022).

Nome do componente	Quantidade (por 100 gramas de vinagre)
Minerais	
Cálcio	14,0 mg
Ferro	0,3 mg
Fósforo	6,0 mg
Magnésio	5,0 mg
Potássio	57,0 mg
Sódio	16,0 mg
Zinco	0,1 mg
Macroconstituintes	
Açúcares	0,6 g
Proteína	0,3 g
Água	93 g

1.3.2 – Formação de Compostos Bioativos no Processo de Produção do Vinagre

Os compostos bioativos são constituintes extra-nutricionais, que incluem: compostos fenólicos, melanoidinas e tetrametilpirazina. Estes componentes apresentam diversos benefícios para a saúde, devido sobretudo às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Ho *et al.*, 2017).

Os sabores e aromas do vinagre são adquiridos durante o processo de fermentação acética. Além do ácido acético, a presença de ácidos orgânicos voláteis, ésteres, cetonas e aldeídos também contribui para as propriedades organolépticas dos vinagres. Estes compostos são produzidos durante os processos de fermentação e envelhecimento, servindo o ácido acético como um dos principais precursores para a sua formação. As matérias-primas e os métodos de produção utilizados para o fabrico do vinagre influenciam diretamente a formação de compostos voláteis (Bekatorou, 2020).

Os ácidos orgânicos que surgem nos vinagres incluem ácidos orgânicos voláteis (como o ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido butírico e ácido quínico) e ácidos orgânicos não voláteis (como o ácido láctico, ácido málico, ácido piroglutâmico, ácido cítrico e ácido succínico). O ácido acético e o ácido láctico são os compostos

predominantes, sendo gerados sobretudo durante a fermentação acética e fermentação alcoólica. As frutas constituem uma matéria-prima fonte de ácidos orgânicos, nomeadamente de ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico e ácido lático (Cocchi *et al.*, 2006). Os ácidos orgânicos, sobretudo o ácido acético, apresentam propriedades antimicrobianas, pois têm a capacidade de penetrar as membranas celulares das bactérias, provocando uma diminuição do pH interno e uma destabilização da respetiva membrana devido à libertação de prótons H^+ , levando à morte celular (Figura 1.2). Para além disso, estes compostos também suprimem a acumulação de gordura, evitando a hiperlipemia, melhoram a resistência à insulina e permitem o controlo da tensão arterial (Ousaaïd *et al.*, 2022).

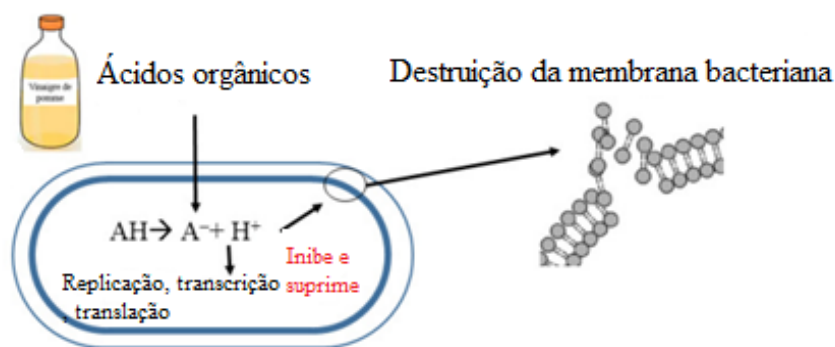


Figura 1.2 - Mecanismo de ação dos vinagres contra bactérias patogênicas. Adaptado de Ousaaïd *et al.* (2022).

Relativamente aos compostos fenólicos que surgem nos vinagres, estes são sobretudo provenientes das matérias-primas. Estudos demonstram que as matérias-primas utilizadas na produção de vinagres de frutas contêm compostos fenólicos abundantes, como por exemplo: catequina, ácido siríngico, ácido gálico, ácido clorogénico, epicatequina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido protocatecuico, ácido p-cumárico e rutina (Aykin *et al.*, 2015; Veberic *et al.*, 2010). Segundo Xia *et al.* (2017), a concentração total de polifenóis nos vinagres aumenta com o tempo de envelhecimento dos produtos, sendo por isso um fator crucial. De forma geral, os compostos fenólicos existentes nos vinagres apresentam uma elevada atividade antioxidante, que permite a redução do *stress* oxidativo e ajuda na regulação do metabolismo lipídico, controlo da tensão arterial, prevenção de doenças cardiovasculares, proteção hepática e efeito anticancerígeno (Varzelloni *et al.*, 2007).

As melanoidinas constituem compostos macromoleculares formados pela combinação de açúcares e compostos azotados (proteínas, aminoácidos, péptidos), através de reações de *Maillard* (Wang *et al.*, 2011). A formação destes compostos em vinagres ocorre sobretudo durante o processamento térmico ou na etapa de envelhecimento, o que influencia diretamente as propriedades organolépticas e a atividade antioxidante e antimicrobiana do produto. As melanoidinas têm a capacidade de reduzir a acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células hepáticas, protegendo o fígado do *stress* oxidativo (Yang *et al.*, 2014). Além disso, segundo Xia *et al.* (2017), as melanoidinas de alto peso molecular apresentam uma atividade antibacteriana significativa contra a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

A tetrametilpirazina é um composto bioativo que resulta de reações de *Maillard*, que ocorrem sobretudo durante o processamento térmico ou na etapa de envelhecimento de vinagres. O processo de fermentação permite a acumulação dos precursores essenciais para a sua síntese. Além de definir o sabor dos vinagres, a tetrametilpirazina também apresenta várias propriedades benéficas, pois inibe a agregação plaquetária, evita a hiperlipemia e possui atividade antioxidante (He *et al.*, 2021).

1.4 - Matérias-primas

O vinagre é produzido a partir de várias matérias-primas ricas em hidratos de carbono ou açúcares fermentáveis. Atualmente existem inúmeros vinagres produzidos a partir de matérias-primas menos dispendiosas, que incluem subprodutos resultantes do processamento de alimentos, frutas de baixa qualidade e excedentes agrícolas (Hutchinson *et al.*, 2019).

A qualidade do produto final está dependente do tipo e composição química da matéria-prima, dos processos de pré-tratamento aplicados e dos processos de produção e envelhecimento (Raspor & Goranovič, 2008; Tesfaye *et al.*, 2002).

1.4.1 - Frutos Fermentados

Os vinagres de frutos podem ser produzidos a partir de sumos ou subprodutos de frutas, sendo de destacar que estes apresentam qualidades nutritivas e sensoriais superiores aos restantes tipos de vinagres por serem ricos em vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos, provenientes do fruto e da fermentação alcoólica (Marques *et al.*, 2010). Na Indústria Alimentar é feito o reaproveitamento de subprodutos de frutas

para a produção de vinagres, permitindo a valorização de excedentes e frutas de segunda qualidade, sem nunca comprometer a qualidade do produto final (Quintana *et al.*, 2021).

O fabrico de vinagres de fruta envolve a preparação da matéria-prima e subsequentes fermentação alcoólica e acetificação (Bekatorou, 2020). A fermentação é considerada o método mais antigo de preservação de frutas. Tradicionalmente, as frutas eram fermentadas para preservação e posterior consumo em períodos de indisponibilidade ou escassez. Todas as frutas contêm água, açúcares, vitaminas, polissacarídeos, minerais e proteínas em pequenas quantidades, porém dependendo do grau de maturação, o nível de açúcares pode variar, tendo implicação no teor final de ácido. A fermentação é responsável por produzir ácidos, ésteres, vitaminas, compostos bioativos e, ao mesmo tempo, pode ocorrer degradação de substâncias tóxicas (Shah & Singhal, 2017).

Diferentes matérias-primas, como o damasco e a malagueta, têm sido utilizadas para a produção de vinagre de frutas. A malagueta é um fruto proveniente da América do Sul, pelo que ambientes quentes e com muito sol favorecem o seu desenvolvimento. Existem inúmeras variedades de malaguetas, que variam não só no seu aspeto e cor, mas também ao nível do sabor picante, que se caracteriza por ser uma propriedade organolética resultante da presença de capsaicina (Compo; Portugal Fresh- Frutas Legumes Flores, 2018). A composição bioquímica das malaguetas frescas está dependente da espécie, das condições ambientais de crescimento e do estágio de maturação. Estes frutos são ricos em ácidos gordos, compostos voláteis e pigmentos. A síntese de carotenoides (pigmentos) ocorre durante a fase de maturação e é responsável pela cor vermelha das malaguetas. A capsantina (vermelho) é o pigmento mais frequente nas malaguetas vermelhas apresentando poder antioxidante. Outros pigmentos importantes incluem o β -caroteno (laranja), violaxantina (amarelo) e anteraxantina (amarelo). Além disso, as malaguetas também são ricas noutros compostos como vitamina C, vitamina E e flavonoides, que apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias (Watts *et al.*, 2018).

O damasco é um fruto que se desenvolve sobretudo em climas continentais temperados, apresentando um grande valor nutritivo. É rico em minerais como o ferro, potássio, magnésio, fósforo e apresenta atividade antioxidante, pois contém polifenóis, flavonoides, vitamina C, vitamina A e uma alta concentração de carotenoides (sobretudo β -caroteno) (Centro de Frutologia Compal, 2022; SEMAGRO, 2015).

1.4.2 - Pré-tratamentos das Matérias-primas para Produção de Vinagre

Os pré-tratamentos das matérias-primas para produção de vinagre englobam todos os processos de extração de açúcares fermentáveis, que variam dependendo do tipo de produto utilizado. Posteriormente a estas etapas segue-se a conversão dos hidratos de carbono fermentáveis em etanol e a respetiva oxidação do etanol em ácido acético (Figura 1.3).

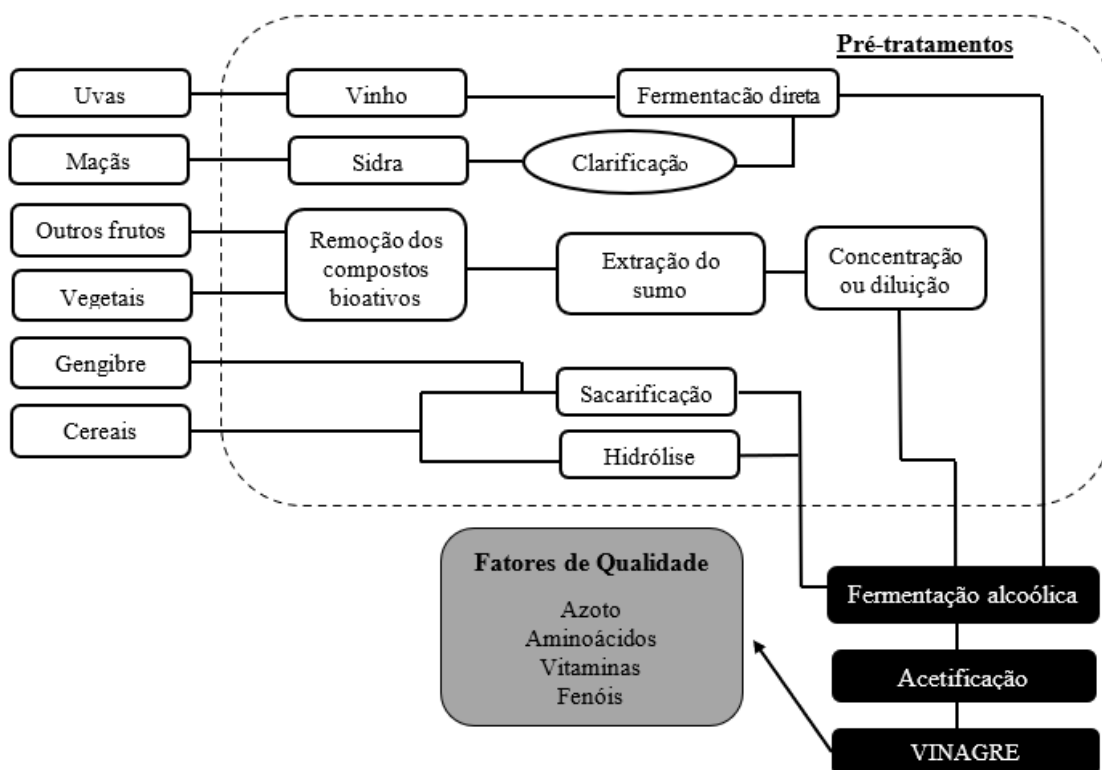


Figura 1.3 - Pré-tratamentos das diferentes matérias-primas utilizadas na produção de vinagres. Adaptado de Bekatorou (2020).

A fermentação direta é aplicada a matérias-primas que contêm apenas açúcares fermentáveis, como o mosto de uva ou sumos de outras frutas. Nestes casos podem ser sujeitas a uma diluição com água, adição de açúcar, filtração e pasteurização. Por exemplo, os vinhos com alto teor alcoólico (10%) requerem uma diluição prévia antes do processo de acetificação (Bekatorou, 2020). A água de coco, que é considerada um subproduto da indústria do coco, também é utilizada para produção de vinagre por fermentação direta após a adição de açúcar. A água de coco sofre uma filtração com posterior adição de açúcar, procedendo-se a uma pasteurização que antecede a fermentação (Othaman *et al.*, 2014).

A sacarificação consiste num processo de hidrólise de um hidrato de carbono complexo nos respetivos monómeros e resulta da aplicação de tratamentos físico/químicos ou enzimáticos. Matérias-primas como o trigo, arroz e cevada necessitam de ser submetidos a este processo para conversão do amido em açúcares fermentáveis, que serão utilizados nas fermentações alcoólica e acética (Bekatorou, 2020; Souza & Magalhães, 2010).

Quanto à extração do sumo de frutas, inicialmente é feita uma seleção e lavagem de forma a remover as frutas danificadas ou impurezas. Dependendo do fruto em questão, poderão ser aplicadas etapas de descasque, corte e remoção da pele e sementes. Após o despulpamento, é aplicado um processo de esmagamento para facilitar a extração do suco contido no fruto, sendo que em alguns casos se recorre a tratamentos enzimáticos (adição de celulasas e pectinases) e térmicos, que facilitam a prensagem, recuperação do caldo, fixação da cor e melhoram o sabor do produto final (Lozano, 2006; Rajauria & Tiwari, 2017). A prensagem mecânica tem sido muito utilizada na produção de vinagre, verificando-se que a textura e tamanho da fruta são fatores cruciais para a seleção dos equipamentos adequados. O líquido resultante deste processo é composto por água, açúcares, ácidos orgânicos, vitaminas, pigmentos, proteínas, minerais, compostos aromáticos e pequenas quantidades de proteínas e gorduras. Para evitar a turvação ou presença de sedimentos no produto final realiza-se uma clarificação (Lozano, 2006).

A recuperação de óleos essenciais pode ser necessária antes da etapa de esmagamento da fruta, uma vez que são constituídos por compostos bioativos com atividade antimicrobiana, que pode afetar a etapa de fermentação. Os métodos tradicionalmente mais utilizados para isolar estes compostos são a destilação a vapor, hidro-destilação, hidro-difusão e extração através de solventes (Leonel *et al*, 2015).

O processo de concentração é aplicado sobretudo em sumos de fruta com o intuito de aumentar o conteúdo de açúcar e concentrar o aroma e sabor do produto. As frutas são trituradas para extração do suco e seguidamente são submetidas a um aquecimento até se atingir uma densidade de açúcar de 28 a 40 °Brix. Após a fermentação alcoólica (antecedida por uma pasteurização), o mosto é centrifugado para remoção do fermento e partículas sólidas e é diluído com água esterilizada para obter o teor alcoólico desejado. Posteriormente, o mosto é inoculado com bactérias acéticas para iniciar o processo de acetificação (Coelho *et al*, 2017).

O acabamento ou clarificação é um processo aplicado tanto nas matérias-primas como no vinagre e tem como objetivo reduzir o aspeto turvo do produto devido à presença

de proteínas, pectinas, taninos, entre outros componentes. Os métodos de clarificação das matérias-primas incluem a sedimentação, filtração simples e utilização de enzimas pectinolíticas. Quanto à clarificação enzimática com pectinases verifica-se que a viscosidade do sumo de frutas diminui devido à degradação da pectina, o que leva à formação de partículas floculantes, que são posteriormente removidas por filtração. Os processos de acabamento incluem a adição de compostos como a gelatina e bentonite que permitem a remoção de partículas indesejáveis. Contudo, uma das desvantagens deste processo é a possível remoção de polifenóis que são essenciais para manter o aroma e sabor do produto final (Heikefelt, 2011).

1.5 - Processos Bioquímicos Envolvidos na Produção de Vinagre

O fabrico de vinagre assenta em dois processos fermentativos distintos, que promovem a conversão das matérias-primas em ácido acético, através da ação de microrganismos. Como se verifica na Figura 1.4, numa primeira etapa ocorre uma fermentação alcoólica conduzida por ação de leveduras, a partir de matérias-primas açucaradas ou amiláceas e numa segunda etapa sucede-se uma acetificação (processo oxidativo) desenvolvida por bactérias, a partir de matérias-primas alcoólicas (Hutkins, 2019; Maestre, 2017).

A fermentação compreende um conjunto de reações controladas enzimaticamente, através das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples, havendo deste modo, libertação de energia (Corazza *et al*, 2001). Este processo engloba fundamentalmente duas etapas: 1) glicólise, em que há degradação da molécula de glicose em ácido pirúvico; 2) redução do ácido pirúvico, que desencadeia a formação dos produtos de fermentação. Na fermentação alcoólica, o ácido pirúvico é convertido em etanol e dióxido de carbono. Durante a etapa de acetificação, o etanol produzido (na fermentação alcoólica) é transformado em ácido acético (Henriques, 2014).

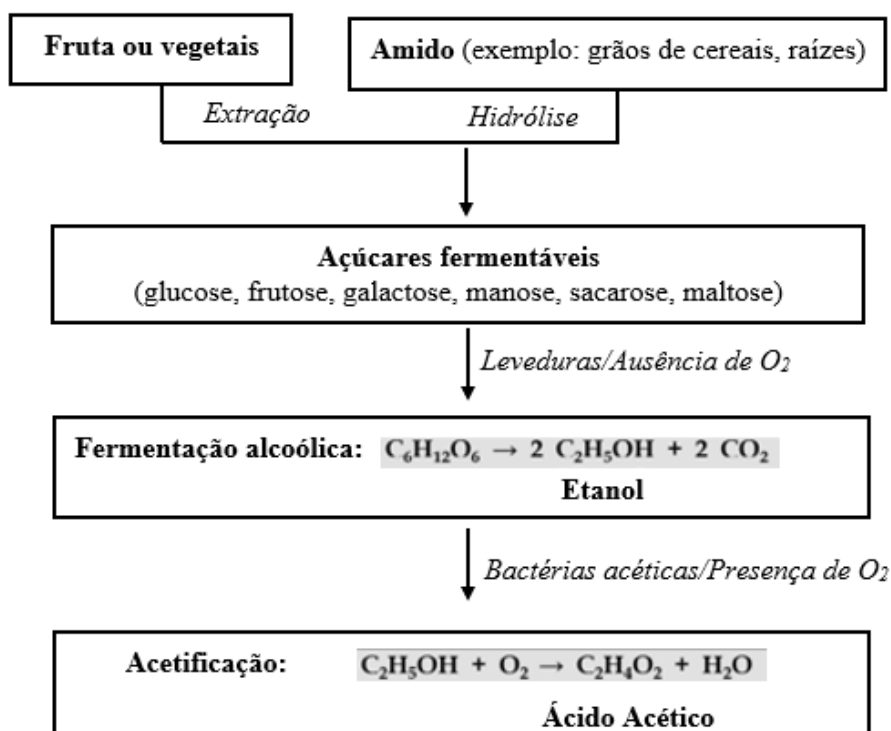


Figura 1.4 - Esquema dos processos fermentativos que ocorrem durante o processamento de vinagre. Adaptado de Bekatorou (2020).

1.5.1 - Fermentação Alcoólica

Por definição a fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que compreende a degradação de moléculas de açúcar por parte de leveduras com o objetivo de produzir energia celular (adenosina trifosfato, ATP), dióxido de carbono e etanol (Figura 1.4). As leveduras realizam a fermentação dos açúcares com o intuito de obter energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol um subproduto resultante (Henriques, 2014; Maestre, 2017). Durante a fermentação alcoólica também são produzidos um elevado número de compostos voláteis responsáveis pelo aroma do vinagre, como por exemplo ácidos gordos e ésteres (Henriques, 2014).

- **Leveduras**

As leveduras pertencem ao reino Fungi e são classificadas em diversos grupos, de acordo com o modo de reprodução: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota*, *Zygomycota*. Na produção de vinagre as espécies com maior interesse pertencem ao filo *Ascomycota* (Solieri & Giudici, 2009).

As leveduras são organismos mesófilos que apresentam uma temperatura ótima de crescimento, variando entre os 20 °C e os 40 °C. Contudo, algumas espécies têm a capacidade de crescer e ser metabolicamente ativas a temperaturas extremas. Por

exemplo, algumas espécies do género *Kluyveromyces* conseguem reproduzir-se e desencadear processos de fermentação a temperaturas superiores a 40 °C. Pelo contrário, algumas espécies do género *Saccharomyces* reproduzem-se a uma temperatura mínima muito baixa e conseguem fermentar a uma temperatura de 0 °C (Solieri & Giudici, 2009).

As leveduras apresentam crescimento a pH entre 3 e 5 e a presença de determinados compostos fornecedores de carbono, nitrogénio, fatores de crescimento (vitaminas e minerais) e outros elementos em menores quantidades (fósforo, potássio, magnésio, enxofre) são essenciais para o seu desenvolvimento (Solieri & Giudici, 2009).

Quanto ao metabolismo respiratório, determinadas leveduras tendem a crescer na presença de oxigénio, utilizando uma grande variedade de compostos de carbono, enquanto outras apresentam uma atividade fermentativa na ausência de oxigénio, especialmente ao metabolizar monossacáridos (Solieri & Giudici, 2009).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada na fermentação alcoólica, uma vez que é tolerante a elevadas concentrações de açúcar e etanol e baixos valores de temperatura e pH (Bekatorou, 2020). Este microrganismo consegue converter os diferentes açúcares em glicose e frutose, que são posteriormente convertidos em piruvato durante a glicólise. Numa primeira fase, cada molécula de piruvato é convertida em acetaldeído através de uma descarboxilação, libertando-se uma molécula de CO₂. Na segunda fase, o acetaldeído formado é reduzido a etanol. Durante a fermentação também ocorre a produção de biomassa celular e de outros produtos como ácidos orgânicos e glicerol (Rodrigues *et al.*, 2018).

São várias as características que tornam as leveduras microrganismos interessantes para processos industriais nomeadamente: facilidade de obtenção e multiplicação; utilização de nutrientes nas suas formas mais simples, capacidade de desenvolvimento em substratos facilmente disponíveis e pouco dispendiosos; pequena exigência de água; e formação de produtos com valor nutritivo (Henriques, 2014).

- **Fatores que Afetam o Desempenho da Fermentação Alcoólica**

A fermentação alcoólica está dependente de um conjunto de fatores para além do tipo de levedura utilizada, que são a temperatura, a disponibilidade de oxigénio, o pH, a natureza química dos nutrientes, a contaminação bacteriana e a concentração de etanol no meio a fermentar (Henriques, 2014).

A temperatura afeta a atividade fermentativa, pois as leveduras apresentam uma temperatura ótima, que maximiza a sua atividade. O pH é outro fator que influencia diretamente a capacidade de reprodução das leveduras, o que afeta de forma indireta a fermentação alcoólica. O controlo e fornecimento de oxigénio em sistemas anaeróbios também é de extrema importância. O oxigénio permite a manutenção da viabilidade celular em casos em que a concentração de substrato é baixa. A limitação de oxigénio funciona como método de controlo da microbiota e conseqüentemente do processo de fermentação. Sem fornecimento de oxigénio os microrganismos não conseguem reproduzir-se, o que condiciona a sua taxa de crescimento celular. O tipo de nutrientes presentes no mosto utilizado para a produção de vinagre também é de extrema importância para a fermentação. Na fase de crescimento exponencial, a multiplicação celular pode ser limitada pela escassez de substrato, entrando precocemente em crescimento estacionário, o que pode desencadear a morte dos microrganismos e o termo do processo de fermentação (Henriques, 2014). A presença de microrganismos patogénicos (provenientes, por exemplo, da matéria-prima) na fermentação alcoólica constitui um dos principais interferentes neste processo. O consumo de açúcar e a inibição e queda da viabilidade das leveduras (devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados durante a fermentação) são efeitos da contaminação bacteriana e traduzem-se numa perda de rendimento. O aumento da concentração de etanol durante a fermentação pode inibir o metabolismo das leveduras (Luís, 2017).

1.5.2 - Acetificação

A acetificação é um processo que ocorre em meio aeróbio e consiste na oxidação do etanol (produzido na fermentação alcoólica) em ácido acético por ação de bactérias acéticas (Figura 1.4). Além do ácido acético são produzidas pequenas quantidade de outros compostos como aldeídos, cetonas, ésteres e outros ácidos orgânicos, verificando-se que o acetaldeído é o composto secundário predominante (Luís, 2017).

Inicialmente ocorre a oxidação do etanol em acetaldeído, reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase (AIDH) e posteriormente o acetaldeído formado é oxidado em ácido acético pela enzima acetaldeído desidrogenase (AcDH). As enzimas intervenientes neste processo estão localizadas na membrana citoplasmática das células das bactérias acéticas. Numa etapa intermédia ocorre ainda a formação de hidrato de acetaldeído, em que o oxigénio funciona como um recetor de eletrões (Figura 1.5). A

conversão de etanol em ácido acético ocorre de forma equimolar, ou seja, a concentração de ácido acético é igual à concentração inicial de etanol (Hutkins, 2019).

A via de produção do ácido acético produz energia, pois as reações de oxidação estão acopladas à cadeia respiratória que gera ATP, através da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. As bactérias acéticas possuem uma notável capacidade para tolerar baixos valores de pH e altas concentrações de etanol e ácido acético, uma vez que as reações metabólicas não ocorrerem no citoplasma, mas sim no espaço periplasmático e na membrana citoplasmática (Figura 1.5) (Hutkins, 2019).

- **Bactérias Acéticas**

As bactérias acéticas (BA) pertencem à família *Acetobacteraceae*. Os gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* e *Komagataeibacter* são os mais comuns no processamento de vinagre porque possuem uma elevada capacidade para oxidar o etanol em ácido acético e resistência ao ácido acético libertado durante a acetificação (Gomes *et al.*, 2018).

As BA são microrganismos estritamente aeróbios, Gram-negativos ou Gram-variáveis, não formadores de esporos, catalase-positivo, oxidase-negativo, elipsoidais ou em forma de bastonete, surgindo isoladamente, em pares ou em cadeia. Além disso, são microrganismos mesófilos, apresentando uma temperatura ótima de crescimento entre os 25 °C e os 30 °C, apesar de algumas espécies serem reconhecidas como termotolerantes. O pH ótimo para a sua reprodução varia entre 5,0 e 6,5, porém também conseguem crescer com valores de pH mais baixos. Apresentam um metabolismo aeróbio obrigatório, funcionando o oxigênio como aceitador final de elétrons. (Mamlouk & Gullo, 2013).

Durante o processo de acetificação, o surgimento das diferentes espécies de BA está dependente da concentração de ácido acético. Na primeira fase, caracterizada por uma baixa concentração de ácido acético, há predominância do gênero *Acetobacter*. Posteriormente, quando a concentração de ácido acético excede os 5%, outros gêneros como *Komagataeibacter* e *Gluconacetobacter* podem dominar (Gomes *et al.*, 2018).

Em geral, os critérios utilizados para distinguir os diferentes gêneros de BA utilizados para produção de vinagre baseiam-se em propriedades bioquímicas e fisiológicas (Gomes *et al.*, 2018).

A classificação do gênero *Acetobacter* é baseada em vários critérios bioquímicos nomeadamente: presença de catalases, oxidação do ácido láctico em ácido carbônico, oxidação do glicerol em di-hidroxiacetona e produção de ácido a partir da D-glucose.

Fisiologicamente as espécies deste género caracterizam-se pela presença ou ausência de flagelos peritríquios. O género *Gluconobacter* foi classificado de acordo com a presença/ausência de flagelos polares, incapacidade de oxidar ácido acético e ácido láctico, capacidade de oxidar D-glucose em ácido glucónico, o qual é posteriormente oxidado em 2-cetogluconato e 5-cetogluconato. Os géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, com exceção do género *Gluconobacter*, têm a capacidade de oxidar o ácido acético produzido em CO₂ e H₂O. Os diferentes géneros de BA apresentam semelhanças quanto à abundância da enzima AIDH. Contudo, esta enzima é menos estável no género *Gluconobacter*, em condições ácidas. Este facto explica a maior resistência das células do género *Acetobacter* ao ácido acético e maior produtividade comparativamente ao género *Gluconobacter*. As espécies do género *Gluconobacter* possuem a coenzima Q10, enquanto as espécies do género *Acetobacter* possuem a coenzima Q9. As espécies do género *Gluconacetobacter* produzem um pigmento castanho solúvel em água e são móveis, enquanto as espécies do género *Komagataeibacter* não produzem este pigmento e são imóveis. Os vários géneros de BA também apresentam diferenças na capacidade de oxidação do etanol e dos açúcares: a produção de ácido glucónico a partir da D-glucose e a cetogénese a partir do glicerol são fracas no género *Acetobacter* mas bastante significantes no género *Gluconobacter*. A oxidação do etanol, D-glucose, ácido glucónico, glicerol e sorbitol nas espécies do género *Gluconobacter* ocorre graças à existência de potentes catalisadores. Pelo contrário, os géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, e *Komagataeibacter* possuem um poderoso sistema para oxidação do etanol, mas uma baixa atividade oxidativa sobre os açúcares (Gomes *et al.*, 2018).

Durante o processo de acetificação do vinagre, as células produtoras de ácido acético são submetidas a concentrações de etanol acima de 12 %. Como o etanol é convertido em ácido acético, o crescimento vigoroso destes microrganismos é mantido mesmo quando a concentração de ácido acético atinge mais de 10 %. Algumas espécies dos géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter* conseguem tolerar concentrações de ácido acético até 20 %. São vários os mecanismos moleculares que garantem esta resistência das BA a elevadas concentrações de ácido acético (Figura 1.5) (Hutkins, 2019):

- Membranas citoplasmáticas menos permeáveis: são constituídas por fosfolípidos (fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina) que reduzem a difusão do ácido acético (Hutkins, 2019; Matsushita *et al.*, 2016);

- Utilização do ácido acético no Ciclo de *Krebs*: o gene *aarA* codifica a enzima citrato sintase e o gene *aarC* codifica a coenzima A transferase (Matsushita *et al*, 2016);
- Transporte do íão acetato intracelular: transporte do ácido acético para o exterior do citoplasma através de transportadores ABC (ATP Binding Cassete) e de bombas de efluxo dependente da força motriz de prótons (H^+) (Matsushita *et al*, 2016);
- Proteínas citoplasmáticas com efeito protetor contra a desnaturação (Matsushita *et al*, 2016).

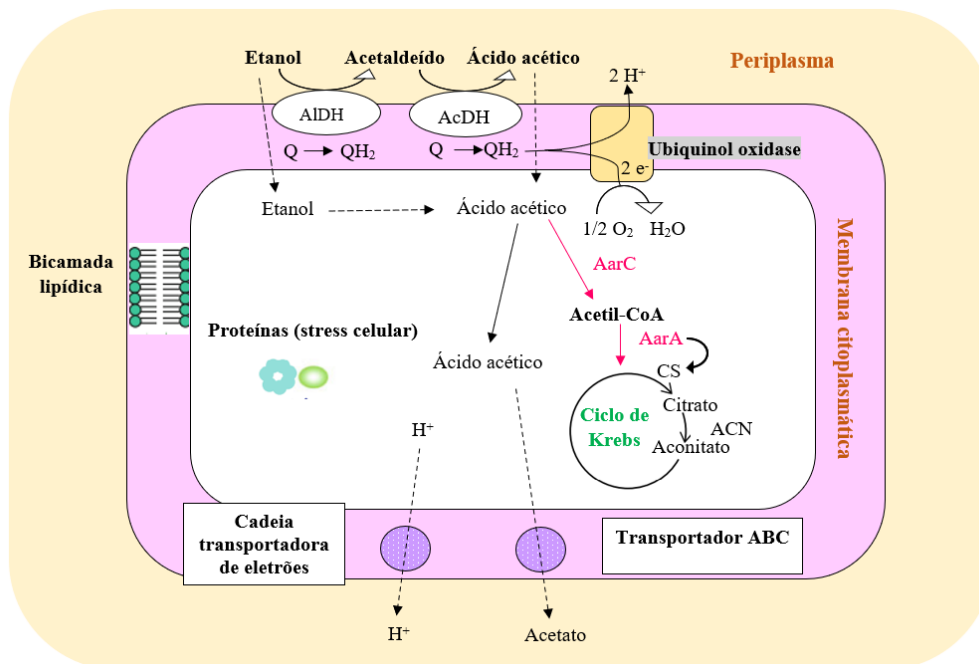


Figura 1.5 - Representação esquemática do processo de acetificação e estratégias moleculares que conferem às bactérias do género *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* resistência ao ácido acético. AIDH (enzima álcool desidrogenase); AcDH (enzima acetaldeído desidrogenase); AarC (gene que codifica a coenzima A transferase); AarA (gene que codifica a enzima citrato sintase); CS (citrato sintase); ACN (aconitase). Adaptado de Hutkins (2019); Matsushita *et al.* (2016); Saichana *et al.* (2015).

• Fatores que Afetam o Desempenho da Fermentação Acética

Durante a acetificação deve realizar-se o controlo de alguns fatores que prejudicam a atividade das BA ou a qualidade do produto final. Exemplos de fatores a ter atenção são, a concentração alcoólica, o fornecimento de oxigénio, a perturbação da película de BA, a temperatura e o pH (Henriques, 2014).

O teor alcoólico afeta o desenvolvimento das bactérias e a qualidade do vinagre, sendo que concentrações superiores a 13 % de álcool dificultam a acetificação, pois o álcool é oxidado de forma incompleta. A acetificação está dependente do fornecimento abundante de oxigênio. Caso este elemento esteja em falta, o metabolismo das bactérias acéticas é afetado, o que prejudica a produção de vinagre. A temperatura e o pH também afetam a atividade oxidativa das bactérias acéticas, pois estas possuem valores de temperatura e pH ótimos, como referido anteriormente, que potenciam o seu rápido desenvolvimento, melhorando assim o rendimento do processo. Nos processos lentos as bactérias desenvolvem-se em forma de uma fina película sobrenadante (constituída por bactérias acéticas e polímeros gelatinosos). A perturbação dessa película resulta no seu rompimento e consequente imersão. Desta forma, embora as bactérias submersas continuem a utilizar os elementos nutritivos da matéria-prima, são incapazes de produzir ácido acético devido à privação de oxigênio (Henriques, 2014).

1.6 - Tecnologias de Produção de Vinagre

Os vinagres comerciais podem ser produzidos por processos de acetificação rápida ou lenta. Os processos lentos são sobretudo utilizados para processamento de vinagres tradicionais, em que a acetificação ocorre lentamente ao longo de semanas ou meses. O método artesanal permite a obtenção de vinagre de fruta com maior qualidade (adquirindo sabores e aromas diferenciados) devido à maior interação entre os microrganismos e os substratos, o que leva à formação de novos compostos com diversas funções biológicas. Este processamento requer intervenções tecnológicas mínimas (Figura 1.6) (Hailu *et al.*, 2012; Ousaaid *et al.*, 2022).

Contrariamente, os processos industriais requerem intervenções tecnológicas, sobretudo de forma a garantir um alto suprimento de oxigênio para acelerar o processo de acetificação, em condições controladas. Inicialmente é adicionado um “vinagre mãe” proveniente de uma acetificação anterior (que contém as culturas bacterianas) ao substrato, utilizando-se seguidamente um sistema de oxigenação contínuo. Os processos rápidos de produção de vinagre têm uma duração entre vinte horas e três dias, contudo, o fornecimento excessivo de oxigênio na etapa da fermentação acética pode degradar moléculas bioativas, não permitindo a formação de novos compostos bioativos, como acontece nos métodos artesanais (Figura 1.6) (Ousaaid *et al.*, 2022).

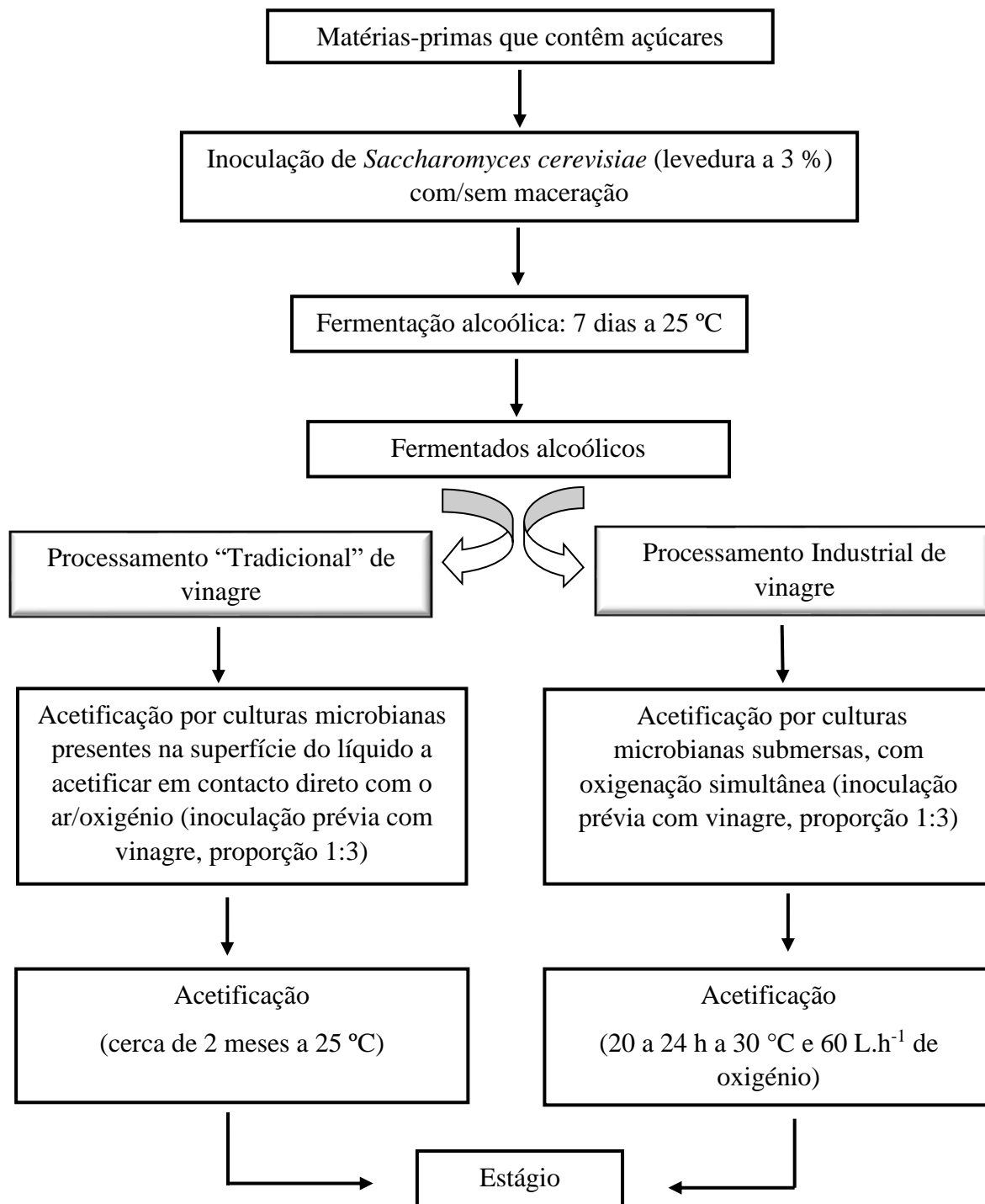


Figura 1.6 – Comparação entre métodos gerais de produção de vinagre (tradicional e industrial). Adaptado de Perestrelo *et al.* (2018).

1.6.1- Processo Lento, de Orleans, Francês ou em Superfície

O processo Lento é o mais antigo e consiste na produção de vinagre a partir de um substrato alcoólico colocado em barricas de madeira parcialmente cheias e decorre à

temperatura ambiente (que pode ser temperatura elevada). Neste caso, a acetificação acontece devido à ação de bactérias acéticas que se desenvolvem à superfície do líquido a acetificar, na sequência da exposição do substrato alcoólico ao ar. As barricas possuem na parte superior uma entrada para o substrato alcoólico, o qual é renovado à medida que o vinagre é produzido e extraído pela torneira de saída (Figura 1.7) (Veloso, 2013).

Para dar início ao processo é recomendado adicionar cerca de 10 % do volume útil do acetificador de um vinagre não pasteurizado, isto é, contendo bactérias ativas, com o objetivo de constituir um inóculo, que contribuirá para uma rápida acetificação inicial. Após quinze dias pode retirar-se 10 % do volume do vinagre da barrica, acrescentando-se o mesmo volume de substrato alcoólico. Posteriormente, a retirada do vinagre e a colocação do substrato pode ser realizada semanalmente (Veloso, 2013).

O vinagre produzido através deste método apresenta uma boa qualidade, sendo praticamente límpido, pelo que, em geral, não é necessário aplicar processos de filtração ou clarificação. Contudo, este tipo de processamento apresenta baixa produtividade, ocupa muito espaço e o fornecimento de oxigénio constitui um fator limitante, pois não tem nenhum sistema de arejamento acoplado (Suman, 2012).

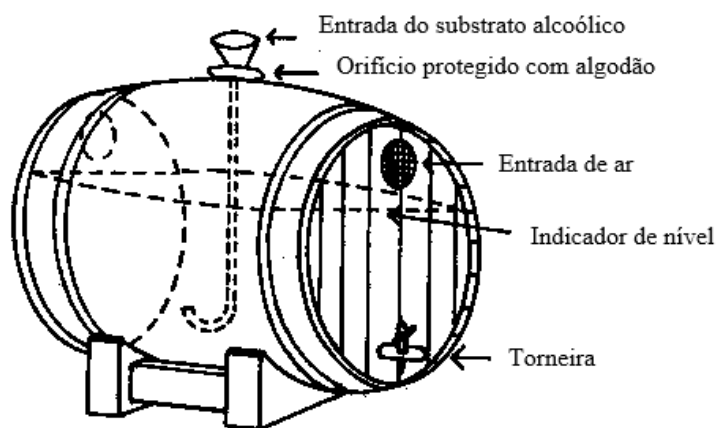


Figura 1.7 - Recipiente utilizado para a elaboração de vinagre pelo processo de Orleans. Adaptado de Veloso (2013).

1.6.2 - Processo Rápido ou Alemão

O método Rápido ou Alemão surgiu na Alemanha no início do século XIX, a partir da observação da importância do arejamento no processo Lento, tendo sido o principal método de produção industrial de vinagre até meados do século XX (Veloso, 2013).

Este sistema de produção utiliza um gerador em formato de tanque cilíndrico, o qual se encontra dividido em três compartimentos: uma secção superior; uma secção intermédia, a qual é preenchida com aparas de madeira, sabugos de milho ou outro material que promova a passagem de ar; e uma secção inferior. Inicialmente o líquido é colocado na parte superior através de um dispositivo borrifador. Seguidamente a matéria-prima passa para a secção intermédia por gotejamento, cujo material de suporte contém as bactérias acéticas imobilizadas à superfície, que promovem a oxidação do etanol a ácido acético. Finalmente, o líquido passa da parte central para a parte inferior, já sob a forma de vinagre, onde é depositado. A entrada de ar ocorre através de orifícios localizados na secção intermédia. Esse ar é aquecido e libertado na parte superior do equipamento, evitando ultrapassar a temperatura de 30 °C, com o auxílio de serpentinas refrigeradoras (Figura 1.8). Durante o processo, circula pelo gerador cerca de 10 % do líquido a ser acetificado, sendo necessário aproximadamente dez dias para que possa ser retirado 10 % do volume inicialmente adicionado (Veloso, 2013).

O processo Rápido pode apresentar dificuldades na manutenção, tanto do espaço físico (deve ser amplo), quanto dos cuidados com a estrutura dos materiais, como o ressecamento da madeira. Durante o processo podem ocorrer contaminações do recipiente (insetos), o que inviabiliza a sua utilização (devendo ser submetido a uma desinfecção ou esterilização), ou o entupimento dos locais de passagem de líquido e de ar devido à proliferação de bactérias acéticas indesejáveis. O custo para implementar alterações neste tipo de tecnologia de produção de vinagre é muito alto, pelo que alguns produtores continuam a utilizar este método (Veloso, 2013).

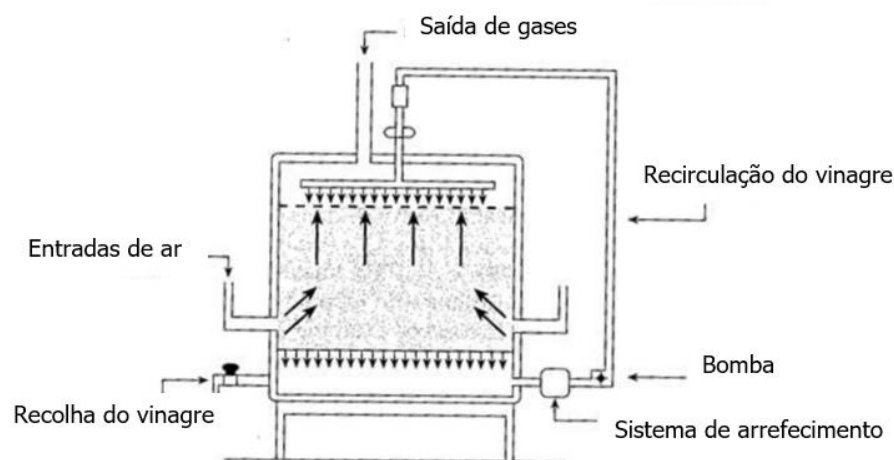


Figura 1.8 - Acetificador utilizado no processo rápido para a produção de vinagre. Adaptado de Aquarone *et al.* (2001).

1.6.3 - Processo Submerso

O processo Submerso surgiu em 1950 e consiste em manter a cultura de bactérias acéticas submersas no líquido a acetificar, local onde se multiplicam e oxidam a mistura alcoólica em vinagre. Para catalisar esta reação é necessário um fornecimento contínuo e adequado de oxigénio (Veloso, 2013). Os equipamentos utilizados neste processo consistem em tanques de fermentação geralmente de ácido inoxidável, com uma capacidade de 10.000 L a 40.000 L, e são constituídos por dispositivos que permitem a monitorização e automatização de vários sistemas operacionais, nomeadamente: sistema de fornecimento de ar, sistema de arrefecimento, sistema de controlo de espuma, sistema de monitorização do etanol, e válvulas de carga e descarga (Figura 1.9) (Ho *et al*, 2017).

O substrato alcoólico é colocado no fermentador e é inoculado com bactérias acéticas ou com um vinagre (proveniente da acetificação anterior). O produto final resultante da acetificação é recolhido (vinagre) de forma automática. O teor alcoólico deverá ser de 0,2 %. Uma parte do produto acetificado é recolhido e a restante parte permanece no tanque, servindo como inóculo para o substrato alcoólico a ser adicionado no próximo ciclo de acetificação (Ho *et al*, 2017). O ar deve ser controlado cuidadosamente, uma vez que o decréscimo da pressão parcial de oxigénio altera o metabolismo bacteriano. A existência de um disco giratório no espaço livre do tanque evita a formação excessiva de espuma. Além disso, o processo de acetificação é exotérmico, sendo fundamental um controlo da temperatura (dentro de uma faixa conveniente) pela dissipação térmica através de uma serpentina. A temperatura ótima de acetificação ronda os 28 °C, dependendo da concentração do substrato. O processo de transformação tem uma duração média de cerca de vinte horas, sendo que o substrato alcoólico pode ser fermentado trinta vezes mais rapidamente do que em qualquer outro método (Aquarone *et al.*, 2001; Suman, 2012).

O equipamento mais utilizado para produção de vinagre em cultura submersa é conhecido por *Acetificador de Frings*, o qual foi desenvolvido na década de 50 e patenteado pela Heinrich Frings-Bonn, Alemanha (Aquarone *et al.*, 2001). Trata-se de um sistema muito eficiente e extremamente rápido, uma vez que há um contacto homogéneo entre as bactérias acéticas, o oxigénio e o álcool em todo o líquido. As perdas por evaporação são mínimas, pois o oxigénio em vez de ser borbulhado continuamente, só é administrado quando a pressão interna cai, devido ao consumo deste (Henriques, 2014). Desta forma, este processo de produção de vinagre destaca-se por apresentar uma

produtividade superior relativamente aos outros métodos. Contudo, apresenta alguns aspetos negativos, tais como elevado custo de investimento inicial, mão-de-obra especializada para os procedimentos de manutenção e necessidade de manter a produção contínua, pois pequenas interrupções no fornecimento de oxigénio podem comprometer o processo. Além disso, o vinagre obtido pode apresentar-se turvo, sendo necessário recorrer, por exemplo a uma filtração para obter a limpidez adequada (Veloso, 2013).

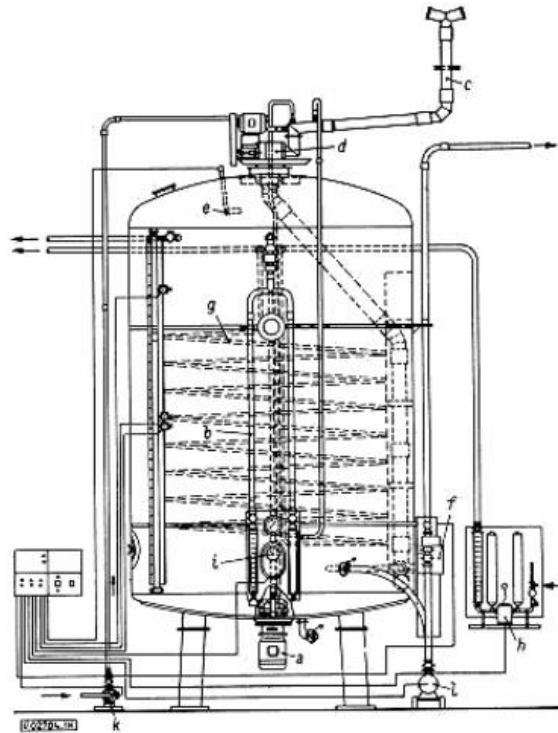


Figura 1.9 - Corte transversal de um acetificador para produção de vinagre pelo método de acetificação em cultura submersa: a) turbina de ar, b) compensador de ar, c) dispositivo para recolher líquido da condensação, d-e) dispositivo para controlar a formação de espuma; f) dispositivo para medir o álcool; g) serpentina para refrigeração; h) dispositivo para refrigeração; i) termómetro; j) bomba para entrada do substrato alcoólico; k) bomba para recolha do vinagre. Adaptado de Veloso (2013).

1.7 - Processos de Finalização do Vinagre

Antes da comercialização do vinagre, o produto resultante da acetificação tem de ser submetido a alguns processos tecnológicos por forma a melhorar as suas características físico-químicas, sensoriais e respetiva estabilidade. Estas operações incluem o armazenamento após a acetificação, processos de clarificação, filtração, envelhecimento e engarrafamento. Em primeiro lugar, o vinagre não deve permanecer no mesmo recipiente onde decorreu a acetificação, pois caso as bactérias não tenham mais

álcool para metabolizar oxidam o ácido acético, alterando a concentração deste ácido no produto final. Como tal, o vinagre obtido deve ser acondicionado em recipientes apropriados, sem contacto com o ar, pois a privação de oxigénio inibe a ação das bactérias (Suman, 2012).

A clarificação é a operação que permite diminuir a turvação do produto, através da remoção de partículas sólidas. Os métodos mais comuns de clarificação incluem: a utilização de substâncias orgânicas ou inorgânicas como clarificantes (albumina, argilas, bentonite, caseína, entre outros), a decantação e a utilização de filtros ou membranas poliméricas (Carneiro *et al*, 2012; Suman, 2012). A filtração é uma técnica geral de clarificação e é definida como a separação de impurezas e microrganismos do líquido com recurso a um material filtrante, como cartuchos filtrantes, membranas filtrantes, filtros rotativos a vácuo e fibras vegetais, permitindo obter um vinagre límpido. O tipo de filtração geralmente mais utilizado é a microfiltração com membranas tangenciais com um diâmetro de poro muito reduzido, que facilita a retenção de partículas de menores dimensões (Aquarone *et al*, 2001). Posteriormente, e quando necessário o vinagre é diluído, de forma a cumprir os valores de acidez total exigidos por lei (Costa, 2014).

De acordo com a matéria-prima utilizada, o vinagre pode ser envelhecido por um período de tempo superior a um ano. Durante este processo ocorrem reações de oxidação e esterificação, as quais são responsáveis pela melhoria do sabor e do aroma dos vinagres, ocorrendo também uma intensificação da cor, limpidez e brilho, o que completa a boa qualidade do produto final (Aquarone *et al*, 2001).

Para o engarrafamento podem ser utilizadas garrafas de vidro ou de tereftalato de polietileno (PET). No entanto, a desvantagem de utilizar o material em PET é a sua permeabilidade aos gases, que embora seja pequena, existe (Costa, 2014).

A estabilização microbiológica do vinagre pode ser mantida através, por exemplo, da aplicação da técnica de pasteurização, que consiste em submeter o produto a temperaturas variáveis entre 50 a 80 °C, com o objetivo de destruir microrganismos e inativar enzimas, que são uma das causas mais importantes de alterações do vinagre (oxidação do ácido acético). A pasteurização pode ser rápida, ocorrendo a 75-80 °C durante 30 a 40 segundos ou lenta, a 50-65 °C, durante 20 a 30 minutos (Suman, 2012).

1.8 - Avanços Tecnológicos na Produção de Vinagre através de Biocatalisadores Imobilizados

A imobilização de biocatalisadores é uma estratégia que pode ser utilizada para a condução de bioprocessos de processamento de vinagre. Esta tecnologia constitui uma ferramenta fundamental para aumentar a eficiência dos processos biotecnológicos e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção. Os biocatalisadores imobilizados são enzimas ou células fisicamente confinadas ou localizadas numa região definida do espaço, com retenção das suas atividades catalíticas, as quais podem ser utilizadas repetida ou continuamente (Carvalho *et al*, 2016).

As dificuldades de recuperação das enzimas livres do meio reacional, aliada à instabilidade e inadequabilidade para o uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes podem ser superadas através da imobilização. Contudo, algumas reações comercialmente importantes envolvem sistemas complexos, que requerem energia e a utilização de cofatores, o que eleva consideravelmente o valor do produto final. Para esses casos recorre-se à imobilização de células, ao invés de enzimas propriamente ditas, garantindo-se assim a eliminação da necessidade de extração e purificação, a regeneração natural de cofatores, a estabilidade operacional superior, o menor custo e o maior rendimento de atividade. A utilização de células imobilizadas tem funcionado como uma alternativa para aumentar a produtividade das fermentações, tradicionalmente realizadas com células em suspensão, uma vez que permite o trabalho com elevadas concentrações celulares no reator, em sistema contínuo, com possibilidade de recuperação da biomassa (Carvalho *et al*, 2016; Ochoa *et al.*, 2011).

1.8.1 - Células Imobilizadas

A imobilização de células pode ser realizada com diferentes suportes que deverão caracterizar-se por apresentar qualidade alimentar, baixo custo, disponibilidade, não serem degradáveis e suportarem baixos valores de temperatura e pH (Carvalho *et al*, 2016). A imobilização de células pode ser realizada através de diferentes técnicas representadas na Figura 1.10, nomeadamente:

- a) Imobilização de células numa superfície sólida por estabelecimento de ligações covalentes, aprisionamento em cavidades da superfície sólida, ou retenção por adsorção física, forças eletrostáticas e outras forças fracas (Bekatorou ,2020; Carvalho *et al*, 2016);

- b) Imobilização em matrizes porosas, que solidificam numa suspensão de células permitindo aprisioná-las (Carvalho *et al.*, 2016);
- c) Imobilização por contenção em membranas, em que as células podem ser restritas a uma membrana semipermeável ou ser aprisionadas numa microcápsula (Bekatorou ,2020; Carvalho *et al.*, 2016);
- d) Imobilização por meio de auto-agregação, que envolve a floculação das células de forma natural ou artificialmente induzida (Carvalho *et al.*, 2016).

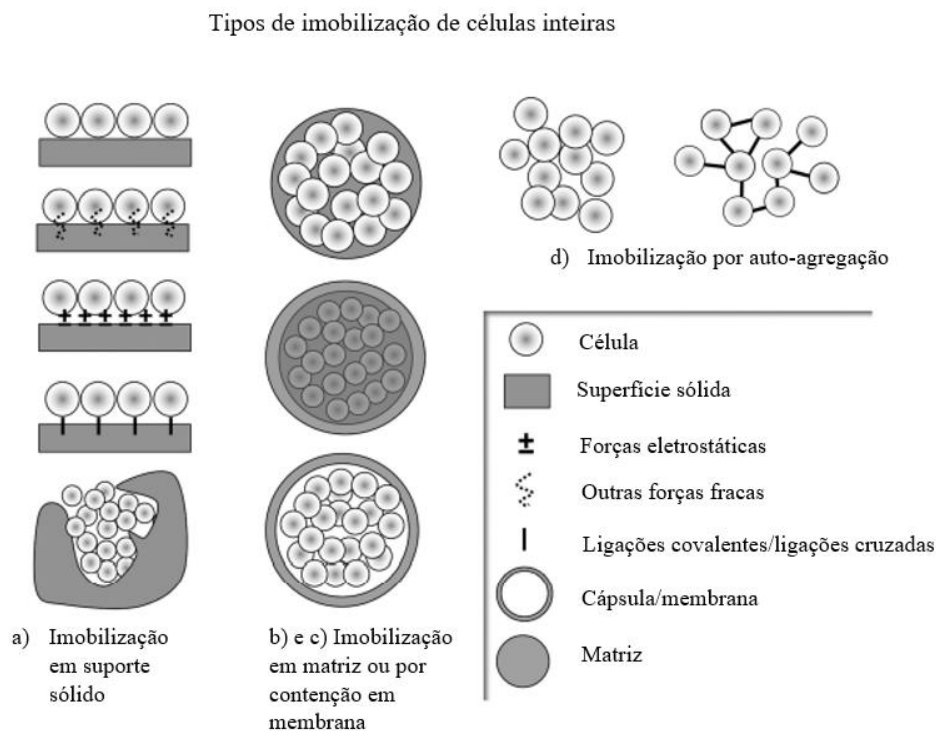


Figura 1.10 - Representação esquemática dos tipos de imobilização celular. Adaptado de Bekatorou (2020).

As BA são bactérias sensíveis, pelo que a utilização de técnicas de imobilização melhora a sua eficiência (Hutchinson *et al.*, 2019). Segundo Hutchinson *et al.* (2019), no geral não existem procedimentos ótimos para imobilização de BA, contudo o método mais utilizado nos sistemas de fermentação industrial é a adsorção de células em superfície sólida, que melhora consideravelmente a produção em comparação com as células livres em suspensão. A ligação por meio de adsorção/ interações iónicas é um método simples e pouco dispendioso, apresentando, contudo, como desvantagem a vulnerabilidade de perda dos biocatalisadores imobilizados para o meio reacional. Por outro lado, a imobilização por meio de ligações covalentes permite uma interação

biocatalisador-suporte mais forte, possuindo como desvantagem o risco de danos na membrana celular das células (Bekatorou ,2020; Carvalho *et al.*, 2016).

O método de aprisionamento em matriz porosa também é comum, embora seja aplicado sobretudo à escala laboratorial (Hutchinson *et al.*, 2019). A natureza da matriz porosa deve permitir a difusão dos substratos e dos produtos, pelo que a imobilização na forma de esferas é geralmente preferida devido à elevada área superficial. Os materiais mais utilizados como matrizes de imobilização são os polímeros hidrofílicos, como os hidrogéis de polissacáridos naturais (alginatos, agar, pectinas), celulose, gelatina, colagénio, quitosano e polímeros sintéticos (poliacrilamida, álcool polivinílico). A imobilização em matrizes hidrofílicas permite a proteção das células contra condições não adequadas de pH, temperatura, solventes orgânicos e compostos inibidores presentes no meio de fermentação. Este processo é sobretudo utilizado à escala laboratorial (Carvalho *et al.*, 2016).

Kocher & Dhillon (2013) produziram um vinagre a partir de um caldo de cana-de-açúcar por fermentação alcoólica utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seguida de uma acetificação semi-contínua utilizando células *Acetobacter aceti* imobilizadas em aparas de madeira num reator de leito fixo, como se encontra representado na Figura 1.11.

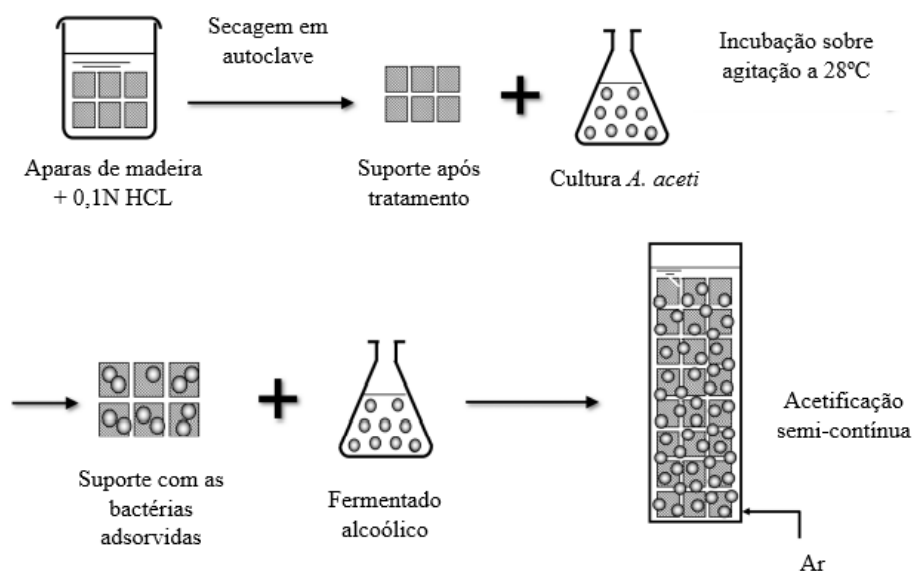


Figura 1.11 - Diagrama de produção de vinagre de cana-de-açúcar utilizando bactérias *A. aceti* imobilizadas por adsorção em aparas de madeira. Adaptado de Bekatorou (2020).

1.9 - Objetivos

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de vinagres obtidos a partir de frutos fermentados (damasco e malagueta), através da análise das características de qualidade microbiológicas e físico-químicas.

Relativamente aos parâmetros microbiológicos, um dos objetivos principais foi avaliar a qualidade microbiológica dos vinagres, através da contagem de bactérias acéticas, bactérias ácido-láticas, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos mesófilos aeróbios. Além disso, pretendeu-se também determinar a atividade antimicrobiana dos vinagres em estudo sobre diversas bactérias e leveduras, através do método de difusão em agar.

Quanto à qualidade físico-química o principal objetivo foi determinar vários parâmetros, tais como a densidade, acidez total, pH, cor, °Brix, composição em compostos fenólicos e flavonoides e capacidade antioxidante dos vinagres em estudo.

2 - Material e Métodos

2.1 - Amostragem

Os vinagres em estudo foram obtidos a partir de frutos fermentados, nomeadamente malagueta e damasco, através de um método de produção artesanal, o Método de Orleans. A empresa Fateixa é responsável pela produção e engarrafamento destes produtos estando localizada em Algoz (Algarve). Os vinagres foram fornecidos em garrafas de vidro com 250 ml. Do ponto de vista químico, o vinagre de malagueta possui uma acidez de 6 % e o vinagre de damasco uma acidez de 7 %. Para efetuar os ensaios laboratoriais utilizaram-se sempre 3 garrafas de cada vinagre.

2.2 - Parâmetros Físico-químicos

Nesta etapa foi efetuada uma avaliação de parâmetros físico-químicos dos vinagres de damasco e malagueta. Os ensaios foram realizados em três garrafas diferentes de cada um dos produtos.

2.2.1 - Determinação da Densidade

A densidade das amostras de vinagre foi determinada através de dois picnómetros de 25 ml, sendo um utilizado para as amostras de vinagre de damasco e o outro para as amostras de vinagre de malagueta. Os picnómetros foram calibrados com água destilada,

pesando-se primeiramente o picnómetro vazio e posteriormente com a amostra de água, em excesso (cobrindo o picnómetro). A amostra de água foi descartada com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* e colocou-se cada uma das amostras de vinagre no respetivo picnómetro procedendo-se à sua pesagem.

A densidade das amostras foi calculada matematicamente através da seguinte fórmula:

$$\rho = \frac{P_a - P_p}{V_p} \quad (\text{Equação 1})$$

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

2.2.2 - Determinação da Acidez Total

A acidez total dos vinagres corresponde ao teor de ácido acético e foi determinada de acordo com o método adaptado de OENO 52-2000 (Organização Internacional da Vinha e do Vinho). Este parâmetro foi determinado por titulação de 1 ml de cada amostra de vinagre, ao qual se adicionou 100 ml de água destilada e cerca de 4 a 5 gotas de solução de fenolftaleína alcoólica a 2 % (May e Baker), utilizando-se como titulante uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M (Riedel-de Haën), até se obter uma cor rosa persistente. A acidez total foi expressa em percentagem, sendo calculada matematicamente através da seguinte equação:

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{I.A.}{\rho \times 10} \quad (\text{Equação 2})$$

onde, I.A. corresponde ao índice de acidez (g/ml) e ρ à densidade de cada amostra de vinagre. O índice de acidez (I.A.) foi calculado através da equação:

$$I.A. = \frac{V_1 \times 0,1 \times 60}{V_2} \quad (\text{Equação 3})$$

em que, V_1 corresponde ao volume da amostra de NaOH (ml); V_2 ao volume da amostra de vinagre (ml); 0,1 à molaridade (M) da solução de NaOH (mol/ml); e 60 ao volume molar do ácido acético (g/mol).

2.2.3 - Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados por medição direta com um potenciômetro (PHM220 Lab pH meter, Meter Lab), constituído por um eléctrodo e uma sonda de temperatura. Antes da leitura do pH das amostras, o aparelho foi calibrado recorrendo-se a duas soluções padrão, uma com pH 4 e outra com pH 7.

2.2.4 - Determinação da Cor

Este parâmetro foi determinado através de um colorímetro (PCE-CSM 10, PCE Instruments spectrophotometer). O seu funcionamento baseia-se nos princípios de reflexão da luz, permitindo medir várias coordenadas de acordo com as escalas de cor Hunter Lab /CIE Lab (Figura 2.1) com iluminante D₆₀ e ângulo de observação de 10° (Rigolon *et al*, 2022):

L- “Luminosidade”, que define a cor relativamente a ser mais clara ou mais escura, variando entre preto (0) e branco (100) (HunterLAB, 1996);

a- Define a “tonalidade” da cor, variando entre vermelho para valores positivos e verde para valores negativos (HunterLAB, 1996);

b- Define a “intensidade ou pureza” da cor, variando entre amarelo para valores positivos e azul para valores negativos (HunterLAB, 1996);

C- “Cromaticidade”, que consiste na saturação, que é definida como a distância radial do centro do espaço até ao ponto da cor (x-rite Pantone, 2016);

h°- “Ângulo Hue”, que consiste no ângulo de tonalidade e é expresso em graus (por exemplo: 0° é vermelho e 90° é amarelo) (x-rite Pantone, 2016);

O colorímetro foi previamente calibrado com padrões de referência branco e preto, tendo-se efetuado 4 leituras para cada amostra de vinagre.

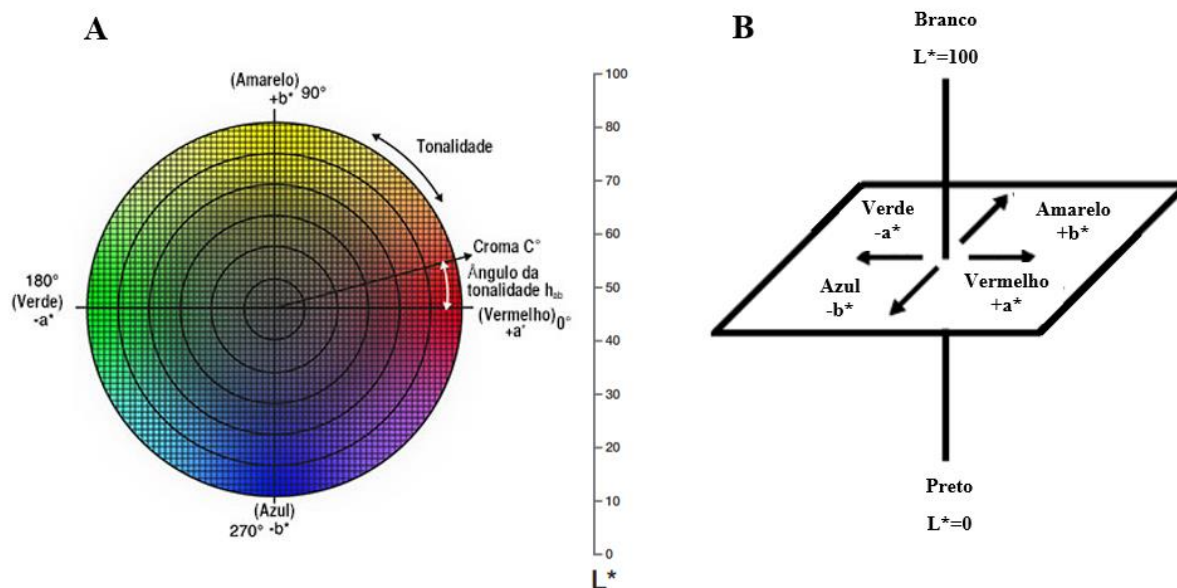


Figura 2.1 Escalas de cor. A: Esquema de espaço cor CIE Lab. Adaptado de x-rite Pantone, (2016) e Konica Minolta, (2022); B: Esquema de espaço cor Hunter Lab. Adaptado de HunterLab, (1996).

2.2.5 - Determinação do Resíduo Seco Solúvel (°Brix)

A determinação do resíduo seco solúvel nas amostras de vinagre foi realizada segundo a NP 785 através de um refratômetro ABBE (ATAGO, digital thermometer). Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur 1 a 2 gotas de amostra de vinagre na superfície do prisma, fechou-se a tampa e ajustou-se com o botão de medida até obter uma imagem nítida do contraste área clara/escuro. O equipamento foi calibrado com água destilada e as amostras foram lidas a uma temperatura de 17,8 °C.

2.2.6 - Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

A pesquisa de compostos fenólicos totais nas amostras de vinagre foi efetuada através do método de Folin-Ciocalteu de acordo com o Regulamento (CEE) N° 2676/90 (1990), com algumas adaptações. O reagente de Folin-Ciocalteu, constituído por uma mistura de ácido fosfotúngstico e de ácido fosfomolibdico, é reduzido, aquando da oxidação dos fenóis, numa mistura de óxidos azuis de tungsténio e de molibdénio (Regulamento CEE N° 2676/90 ,1990).

Para preparação dos tubos das amostras para o ensaio procedeu-se inicialmente a uma diluição dos vinagres na razão de 1:10. Em seguida, adicionou-se 0,2 ml de cada amostra de vinagre diluída, 1 ml de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N (Sigma) e 0,8 ml de solução saturada de carbonato de sódio 7,5 % (Merck), homogeneizando-se no vórtex.

A mistura foi colocada em repouso durante 30 minutos, ao abrigo da luz, de modo a obter a estabilização da reação. A absorvância das amostras foi lida a 765 nm num espectrofotómetro (Genesys 10 UV scanning).

Recorreu-se a uma curva de calibração de ácido gálico com várias concentrações, nomeadamente 0,025; 0,05; 0,1 e 0,15 mg/ml, para calcular a quantidade de compostos fenólicos totais nas diversas amostras de vinagre. As soluções padrão foram preparadas através da adição de água destilada e solução de ácido gálico (Acros Organics) nas respetivas concentrações. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/100 ml de amostra. A reta de calibração utilizada foi:

$$Abs\ 765\ nm = 3,4881 \times [Ácido\ gálico] + 0,1833, \text{ onde } R^2 = 0,9716 \text{ (Equação 4)}$$

2.2.7 - Determinação dos Compostos Flavonoides Totais

A concentração de compostos flavonoides totais foi determinada segundo o método descrito por Zhishen *et al.* (1999). Inicialmente misturou-se 4 ml de água e 0,3 ml de NaNO₂ (5 %) (Riedel-de Haën) a 1 ml de cada amostra de vinagre e agitou-se a solução no vórtex, a qual permaneceu cerca de 5 minutos em repouso, no escuro. Em seguida adicionou-se 0,3 ml de AlCl₃ (2 %) (Riedel-de Haën), homogeneizou-se a solução no vórtex, a qual permaneceu também em repouso, no escuro, durante cerca de 6 minutos. Por último adicionou-se 2 ml de NaOH (1 M) e 2,4 ml de água destilada à mistura e determinou-se a absorvância a 510 nm no espectrofotómetro (Genesys 10 UV). O catião alumínio forma complexos estáveis com os compostos flavonoides em metanol, facilitando a sua quantificação (Lianda & Castro, 2008).

A determinação dos compostos flavonoides foi realizada com base numa reta de calibração de catequina a partir de soluções padrão com diferentes concentrações, nomeadamente 10, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/ml, e os resultados foram expressos em mg de catequina/100 ml de amostra. A reta de calibração obtida foi:

$$Abs\ 510\ nm = 0,0025 \times [Catequina\ (mg/L)] - 0,0133, \text{ onde } R^2 = 0,9803 \text{ (Equação 5)}$$

2.2.8 - Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das amostras de vinagre foi determinada através do método DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazilo) (Aldrich) descrito pelo autor Bakir *et al.* (2017). O radical da molécula apresenta cor violeta escuro e após a reação com a substância antioxidante torna-se amarelo ou violeta-claro (Silveira *et al.*, 2018).

Primeiramente misturaram-se 5 ml de DPPH e 0,1 ml de cada amostra de vinagre em tubos de ensaio, os quais foram seguidamente homogeneizados no *vórtex*. As soluções foram colocadas num banho de água a 27 °C, na ausência de luz, durante 13 minutos. Posteriormente, os valores de absorvância foram lidos a 515 nm num espectrofotómetro (Genesys 10 UV).

Os valores de atividade antioxidante foram calculados através de uma reta de calibração de Trolox (Aldrich), que constitui um antioxidante padrão de referência, com soluções padrão com diferentes concentrações: 0,08; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35 e 0,4 mg/ml, sendo que os resultados foram expressos em mg de Trolox/ml de amostra. A reta de calibração determinada foi:

$$Abs\ 515\ nm = -0,4548 \times [Trolox\ (mM)] + 1,0644, \text{ onde } R^2 = 0,9923 \text{ (Equação 6)}$$

2.3 - Parâmetros Microbiológicos

Nesta etapa foi realizada uma avaliação da qualidade microbiológica e da atividade microbiana dos vinagres em estudo. Estas análises microbiológicas foram efetuadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve. Os ensaios foram realizados em três garrafas diferentes de cada um dos produtos, sendo que as amostras de vinagre foram utilizadas no estado puro, sem se proceder a qualquer diluição.

2.3.1 - Avaliação da Qualidade Microbiológica

A avaliação da qualidade microbiológica dos vinagres foi efetuada através do estudo de diversos parâmetros microbiológicos, nomeadamente: bactérias acéticas, bactérias ácido-láticas, leveduras, fungos filamentosos e microrganismos mesófilos aeróbios.

Para proceder a este estudo foram preparados antecipadamente diferentes meios de cultura, cujo pH foi corrigido para 5,5 utilizando uma solução de ácido clorídrico 1M: “*Acid Acetic Bacteria Medium*” (BAA) (Kim, *et al.*, 2019), “*Man, Rogosa and Sharpe Agar*” (MRS) (Scharlau, Sentmenat), “*Malt Extract Agar*” (MEA) (Scharlau, Sentmenat), “*Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol*” (DRBC) (Biolife, Milano), “*Plate Count Agar*” (PCA) (HiMedia, Mumbai). Estes meios de cultura foram esterilizados em autoclave (Uniclave 88 AJC) e submetidos a refrigeração até à sua utilização.

Todo o material utilizado, tais como pontas, espalhadores, frascos (Duran) e gobelets, foi previamente esterilizado.

2.3.1.1 - Bactérias Acéticas (BA)

A contagem de BA foi realizada de acordo com o método referido por Kim, *et al.* (2019). Para a enumeração destas bactérias utilizou-se o meio de cultura BAA, o qual foi obtido a partir da junção de diversos constituintes, descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Composição do meio de cultura BAA.

Constituinte	Quantidade
D (+)- Glucose	50 g
Extrato de levedura	10 g
Azul de bromofenol	20 mg
Agar	20 g
Água	950 ml
Ácido acético glacial	1 ml
Etanol puro	50 ml

Inicialmente misturou-se D (+) - glucose (Scharlau), extrato de levedura (Biokar), azul de bromofenol, agar (V.R) e água, seguindo-se a sua esterilização em autoclave (Uniclave 88 AJC) durante 15 minutos a 121 °C. Após arrefecimento a 50 °C, num banho de água, adicionou-se assepticamente ácido acético glacial (Merck) e etanol puro (Panreac), utilizando-se material estéril.

A técnica consistiu na inoculação de 0,2 ml de vinagre em cada placa de Petri, na superfície do meio de cultura, seguido do espalhamento da amostra. No total foram inoculadas 5 placas para cada garrafa de vinagre. As placas foram incubadas a 30 °C numa estufa (Binder) durante 7 dias. Após o período de incubação procedeu-se à contagem do número colónias e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por unidade de volume (UFC/ml).

2.3.1.2 - Bactérias Ácido-Láticas (BAL)

A contagem de BAL foi realizada com base no procedimento descrito na norma ISO 15214 (ISO,1998). Neste método utilizou-se o meio de cultura MRS (Scharlau), que favorece o crescimento, isolamento e contagem de bactérias lácticas, que possam estar presentes em determinados alimentos e bebidas (Scharlau, 2022a).

A técnica foi realizada através da inoculação de 1 ml de vinagre no centro das placas de Petri (estéreis e vazias) seguida da incorporação do meio MRS fundido (em forno de micro-ondas) e com pH de 5,5. O meio de cultura foi misturado com as amostras através da rotação lenta das placas de Petri, ficando em repouso para solidificar. Posteriormente, adicionou-se uma segunda camada do mesmo meio às placas e deixou-se solidificar. As placas foram depois incubadas numa estufa (Binder) a 30 °C durante 7 dias. No total foram inoculadas 12 placas, ou seja, 2 placas para cada garrafa de vinagre. Após o período de incubação procedeu-se à contagem do número de colónias e os resultados foram expressos em UFC/ml.

2.3.1.3 - Leveduras

A contagem de leveduras foi realizada com base no procedimento descrito na norma ISO 21527-2 (ISO, 2008), utilizando o meio de cultura MEA (Scharlau), com pH 5,5. Este meio permite a deteção, isolamento e contagem de fungos, particularmente leveduras (Scharlau, 2022b).

O procedimento consistiu na inoculação de 0,2 ml de vinagre na superfície do meio de cultura seguido do espalhamento da amostra. No total foram semeadas 30 placas, ou seja, 5 placas para cada garrafa de vinagre. As placas foram incubadas numa estufa (Binder) a 25 °C durante 7 dias. Após o período de incubação procedeu-se à contagem do número colónias e os resultados foram expressos em UFC/ml.

2.3.1.4 - Fungos Filamentosos

A contagem de fungos filamentosos foi realizada com base no método descrito na norma ISO 21527-2, tendo-se utilizado o meio de cultura DRBC (Biolife). Este meio é utilizado para o isolamento seletivo e enumeração de leveduras e bolores em produtos destinados ao consumo humano com atividade da água superior a 0,95 (ISO, 2008).

O procedimento consistiu na inoculação de 0,2 ml de vinagre na superfície do meio de cultura seguido do espalhamento da amostra. No total foram inoculadas 30 placas, ou seja, 5 placas para cada garrafa de vinagre. As placas foram incubadas numa estufa (Binder) a 25 °C durante 7 dias. Após o período de incubação procedeu-se à contagem do número colónias e os resultados foram expressos em UFC/ml.

2.3.1.5 - Microrganismos Mesófilos Aeróbios (MMA)

A contagem de MMA foi realizada com base no método descrito na norma ISO 4833-1, com algumas modificações (ISO, 2013).

Para contagem destes microrganismos utilizou-se o meio de cultura PCA (HiMedia) com pH 5,5. Este meio de cultura é recomendado para a enumeração de microrganismos em alimentos e águas.

A técnica foi realizada através da inoculação de 0,2 ml de vinagre na superfície do meio de cultura seguido do espalhamento da amostra. No total foram inoculadas 60 placas, ou seja, 10 placas para cada garrafa de vinagre. As placas foram incubadas numa estufa (Binder) a 30 °C durante 7 dias. Após o período de incubação procedeu-se à contagem do número colónias e os resultados foram expressos em UFC/ml.

2.3.2 - Avaliação da Atividade Antimicrobiana

As propriedades antibacterianas e antifúngicas de vinagres obtidos a partir de fermentados e acetificados de damasco e malagueta foram testadas em vários microrganismos mencionados na Tabela 2.2. Para este ensaio utilizaram-se três garrafas de cada um dos produtos.

Tabela 2.2 - Microrganismos utilizados para o estudo da atividade antimicrobiana dos vinagres de damasco e malagueta.

Bactéria	Levedura
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 10876)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (YPO 186)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PYCC 3507)
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium (ATCC 14028)	<i>Pichia membranifaciens</i> (PYCC 2489)
<i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090)	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (PYCC 4806)
<i>Cronobacter sakazakii</i> (ATCC 29544)	<i>Debaryomyces hansenii</i> (PYCC 2968)

As bactérias e leveduras necessárias ao estudo foram primeiramente repicadas. Os meios de cultura utilizados para a inoculação destes grupos microbianos foram os seguintes: “Mueller-Hinton” (MH) (Oxoid); “Mueller-Hinton” com adição de 2 % de glucose (MH + 2 % G) (Oxoid); e “Yeast Mold Agar” (YM). Estes meios de cultura foram previamente preparados, procedendo-se a uma correção do pH para 5,5 com uma solução de ácido clorídrico 1M. Por fim, foram esterilizados em autoclave (Uniclave 88 AJC) e refrigerados até à sua utilização.

Quanto à atividade antimicrobiana, as culturas de bactérias (Tabela 2.2) foram testadas no meio de cultura MH, através do método de difusão em agar, também conhecido por método de Kirby-Bauer. O procedimento adotado foi baseado nos protocolos do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Eucast, 2022). Foram preparadas suspensões das bactérias em tubos contendo 5 ml de solução salina (0,85 % NaCl), através da adição de uma pequena porção de colónias. A turvação da suspensão foi ajustada por comparação com o padrão 0,5 de *Mc Farland*. Mergulharam-se zaragatoas estéreis nas suspensões bacterianas preparadas e inocularam-se as respetivas placas de Petri contendo o meio de cultura (ao longo de três eixos de inoculação). Após a inoculação colocaram-se asépticamente dois discos de papel (Oxoid) em cada uma das placas. Um dos discos foi impregnado com 20 µL de amostra de vinagre e o outro com 20 µL de solução salina estéril, constituindo o controlo negativo.

A atividade antifúngica dos vinagres também foi avaliada através da técnica de difusão em agar. As estirpes de *Candida albicans* foram testadas no meio de cultura MH + 2 % G, enquanto as restantes leveduras (Tabela 2.2) foram testadas no meio de cultura

YM. A turvação das suspensões de leveduras previamente preparadas foi acertada a valores dos padrões de *Mc Farland* de 0,5 a 1.

Utilizaram-se antibióticos e antimicóticos de referência, descritos na Tabela 2.3, que constituíram os controlos positivos.

Tabela 2.3 - Antibióticos e antimicóticos testados para os microrganismos em estudo.

Antibiótico	Disco	Antimicótico	Disco
Ampicilina (Oxoid)	10 µg	Nistatina (Oxoid)	100 unidades (U)
Penicilina G (Oxoid)	10 unidades (U)	Fluconazol (Oxoid)	25 µg
Cloranfenicol (Oxoid)	30 µg	Anfotericina	10 µg
Eritromicina (Liofilchem)	15 µg	B (Liofilchem)	

Os discos com antibióticos e antimicóticos foram colocados assepticamente nas placas inoculadas com cada suspensão microbiana anteriormente preparada, e inoculadas utilizando 3 eixos de inoculação. Ao fim de 15 minutos após a aplicação dos discos, as placas inoculadas foram colocadas na estufa (Binder) a 30 °C. Quanto às bactérias, o período de incubação foi de 24 horas e no caso das leveduras foi de 48 horas.

Após o período de incubação as placas foram observadas e fez-se um registo dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano em milímetros.

2.4 - Estudo Estatístico

Os resultados experimentais obtidos foram representados como valores médios das várias medições \pm o desvio padrão. O estudo estatístico dos diversos parâmetros físico-químicos e microbiológicos para caracterização dos vinagres foi realizado com base num teste de t para amostras independentes. Assumiu-se um nível de significância (α) de 0,05, sendo que as diferenças foram consideradas significativas quando p (p-value) $< 0,05$. A análise estatística foi efetuada utilizando a ferramenta análise de dados do Microsoft® Excel® para Microsoft 365 (versão 16).

3 - Resultados e Discussão

3.1 - Parâmetros Físico-químicos

Para avaliar as características físico-químicas dos vinagres de damasco e malagueta em estudo, foram comparados diferentes parâmetros, particularmente a cor, °Brix, pH, acidez total, compostos fenólicos totais, compostos flavonoides totais e atividade antioxidante.

3.1.1 - Propriedades Físico-químicas

As características físico-químicas dos diferentes vinagres, mais precisamente o pH, acidez total e °Brix estão representados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Propriedades físico-químicas das amostras de vinagre de damasco e malagueta.

Vinagres	Parâmetros		
	pH	Acidez total (g/100 ml de ácido acético)	°Brix
Damasco	3,23±0,01	7,33±0,05	5,13±0,12
Malagueta	2,71±0,01	6,09±0,15	5,10±0,00
<i>Teste t de Student</i>	$t = 2,78$ $p = 2,66 \times 10^{-7}$	$t = 2,78$ $p = 1,74 \times 10^{-4}$	$t = 2,78$ $p = 0,64$

Os valores correspondem às médias \pm desvios-padrão das amostras (n = 3). Os resultados do teste *t de Student* para amostras independentes são apresentados como *t* e valor *p*.

Os valores de pH dos vinagres em estudo estão compreendidos entre 2,71±0,01 e 3,23±0,01 e os valores de acidez total entre 7,33±0,05 e 6,09±0,15 % de ácido acético. De acordo com o Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio, os valores de acidez total obtidos para todas as amostras de vinagre estão em conformidade relativamente ao limite mínimo legalmente estabelecido (5 g/100 ml). Contudo, no estudo de Hammouda *et al.* (2021) foi feita a caracterização físico-química de amostras de vinagre tradicionais, tendo-se obtido valores de pH e acidez total compreendidos entre 3,61±0,01 e 4,08±0,01 e 1,82±0,13 e 4,88±0,05 % de ácido acético, respetivamente. Segundo os autores, estes valores não estão em conformidade com os valores de acidez total estabelecidos pelas normas reguladoras da Comissão do *Codex Alimentarius* (60 g/l para vinagres de vinho e 50 g/l para outros tipos de vinagre). No estudo de Ozturk *et al.* (2015) foram analisados e comparados vinagres tradicionais e industriais, obtendo-se valores de pH compreendidos

entre $2,63\pm 0,02$ e $3,90\pm 0,02$. Quanto à acidez total, os valores obtidos variaram entre $0,32\pm 0,03$ e $7,20\pm 0,12$ % de ácido acético, tendo-se verificado que 80 % das amostras tradicionais de vinagre não estava em conformidade com os regulamentos implementados pela Turquia e Estados Unidos, que aprovam um valor mínimo de acidez total de 40 g/l. Pelo contrário 80 % dos vinagres industriais apresentaram valores concordantes com a legislação em vigor.

No estudo de Bakir *et al.* (2017), o intervalo de valores de pH e acidez total dos diversos vinagres de frutas em estudo foi de 2,8 a 3,9 e $0,7\pm 0,10$ a $6,6\pm 0,20$ % de ácido acético respetivamente. De acordo com o Decreto-Lei nº 174/2007, de 8 de maio e as normas estabelecidas pela Comissão do *Codex Alimentarius*, apenas uma amostra de vinagre está em concordância com os limites mínimos legalmente permitidos. Em relação aos regulamentos implementados pela Turquia e Estados Unidos, cerca de apenas 28 % das amostras de vinagre cumprem os requisitos exigidos.

Os resultados obtidos neste estudo para o vinagre de damasco são semelhantes com os valores de pH e acidez total obtidos no estudo de Sengun *et al.* (2020) que foram de $3,33\pm 0,007$ e $4,27\pm 0,01$ % de ácido acético, respetivamente.

Quanto ao pH, os vinagres de damasco e malagueta são significativamente diferentes (teste, $t = 2,78$; $p < 10^{-4}$), podendo-se tirar a mesma conclusão no que diz respeito à acidez total (teste, $t = 2,78$; $p < 10^{-4}$).

No que diz respeito ao °Brix, que corresponde à percentagem de resíduo seco solúvel, verificou-se que as amostras de vinagre de damasco apresentaram valores ligeiramente superiores relativamente às amostras de vinagre de malagueta como se observa na Tabela 3.1, o que permite concluir que este parâmetro se altera de acordo com o tipo de vinagre (Sengun *et al.*, 2020). Segundo Sáiz-Abajo *et al.* (2004), o °Brix indica a percentagem de sólidos solúveis numa amostra aquosa, incluindo açúcares, sais e proteínas. Contudo, geralmente este parâmetro equivale sobretudo à percentagem de açúcares presentes na amostra, omitindo os restantes materiais solúveis. No estudo de Sengun *et al.* (2020), os valores de °Brix para os diferentes vinagres em estudo variaram entre $1,00\pm 0,00$ e $5,00\pm 0,00$. Além disso, verificou-se que as amostras de vinagre de damasco apresentaram valores de °Brix de cerca de $2,00\pm 0,00$, resultados estes inferiores a grande parte dos restantes vinagres de fruta, com exceção dos vinagres de maçã e rosamosqueta. Os resultados para as amostras de vinagre de damasco obtidos por Sengun *et al.* (2020) foram inferiores aos resultados obtidos neste estudo (°Brix = $5,13\pm 0,12$), uma

vez que este parâmetro varia bastante de acordo com o teor de açúcares presente na matéria-prima utilizada.

Em Ozturk, *et al.* (2015), os valores de °Brix dos diferentes vinagres tradicionais e industriais em estudo variaram entre $1,02 \pm 0,07$ e $20,80 \pm 0,03$, o que representa uma grande variabilidade. Segundo o autor a percentagem de resíduo seco solúvel está diretamente relacionada com a fermentação, pois o nível de açúcares diminui de acordo com a atividade dos microrganismos. Além disso o tipo de culturas “starter” e as matérias-primas utilizadas constituem também fatores de variabilidade para o °Brix.

Contrariamente ao pH e acidez total, no parâmetro °Brix os vinagres de damasco e malagueta não apresentam diferenças significativas (Tabela 3.1).

O parâmetro cor foi avaliado tendo em conta as coordenadas L* (luminosidade), a* (cor vermelho/verde), b* (cor amarelo/azul), C* (saturação da cor) e h° (ângulo de tonalidade), cujos resultados estão representados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Parâmetro de cor das amostras de vinagre de damasco e malagueta.

Vinagres	Parâmetros				
	L*	a*	b*	C*	h°
Damasco	$30,39 \pm 0,02$	$-0,03 \pm 0,12$	$2,61 \pm 1,22$	$3,37 \pm 0,15$	$90,57 \pm 2,10$
Malagueta	$30,63 \pm 0,53$	$-0,38 \pm 0,10$	$2,78 \pm 0,24$	$2,81 \pm 0,24$	$97,57 \pm 1,66$
<i>Teste t de Student</i>	$t = 2,78$ $p = 0,47$	$t = 2,78$ $p = 0,02$	$t = 4,30$ $p = 0,83$	$t = 2,78$ $p = 0,02$	$t = 2,78$ $p = 0,01$

Os valores correspondem às médias \pm desvios-padrão das amostras (n = 3). Os resultados do teste *t de Student* para amostras independentes são apresentados como *t* e valor *p*.

Analisando os resultados da Tabela 3.2 verifica-se que quanto à luminosidade, as amostras de vinagre de malagueta ($30,63 \pm 0,53$) apresentarem valores ligeiramente superiores aos valores das amostras de vinagre de damasco ($30,39 \pm 0,02$), possuindo como tal maior luminosidade. Contudo, em termos estatísticos as amostras de ambos os vinagres não diferem significativamente (teste, $t = 2,776$; $p = 0,473$). Os vinagres de damasco e malagueta apresentam uma tonalidade a tender para o esverdeado/amarelado, pois apresentaram valores negativos para a coordenada a* ($-0,03 \pm 0,12$; $-0,38 \pm 0,10$) e valores positivos para a coordenada b* ($2,61 \pm 1,22$; $2,78 \pm 0,24$). Quanto à coordenada a*,

os vinagres diferem significativamente (teste, $t = 2,78$; $p = 0,02$), verificando-se que as amostras de vinagre de damasco possuem valores superiores relativamente ao vinagre de malagueta. No entanto, em relação à coordenada b^* , os vinagres não são significativamente diferentes (teste, $t = 4,30$; $p = 0,83$). No que diz respeito à coordenada cromaticidade (C^*) constata-se que os vinagres são estatisticamente diferentes (teste, $t = 2,78$; $p = 0,02$). A mesma tendência se verifica para o ângulo de tonalidade h° , em que estatisticamente ambos os vinagres diferem significativamente (teste, $t = 2,78$; $p = 0,01$), concluindo-se que as amostras de vinagre de malagueta possuem um ângulo maior comparativamente às amostras de vinagre de damasco. Estas diferenças observadas entre os diferentes vinagres podem estar relacionadas com o teor de fitoquímicos presentes nas matérias-primas, o que influencia diretamente a cor do produto final (Hammouda *et al.*, 2021). Neste caso, a malagueta é rica em diversos pigmentos como a capsantina, β -caroteno, violaxantina e anteraxantina e o damasco é rico sobretudo em β -caroteno, componentes estes que contribuem para a cor do vinagre (Centro de Frutologia Compal, 2022; SEMAGRO, 2015; Watts *et al.*, 2018).

No estudo de Hammouda *et al.* (2021) também foram avaliadas as propriedades de cor de amostras de vinagre. A variabilidade dos resultados foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Os valores de L^* , a^* e b^* variaram na faixa de $0,13 \pm 0,06$ - $68,83 \pm 1,43$; $1,15 \pm 0,34$ - $9,98 \pm 0,15$; $0,34 \pm 0,10$ - $30,34 \pm 0,19$, respetivamente. De acordo com o aspeto visual, os maiores valores de L^* e b^* foram observados para as amostras de vinagre de uva, enquanto o valor mais elevado de a^* foi registado nas amostras de vinagre de figo. Os valores das coordenadas C^* e h° foram variáveis entre as amostras de vinagre indicando assim que as propriedades da cor das diversas amostras foram muito diferentes umas das outras.

Segundo o estudo dos autores Ozturk *et al.* (2015) foram avaliadas as propriedades da cor de amostras de vinagres tradicionais e industriais. Os valores para L^* variaram entre $0,28 \pm 0,04$ e $20,15 \pm 0,19$, verificando-se que os vinagres tradicionais de maçã apresentaram os valores mais elevados para esta coordenada, exceto para uma amostra. Os valores de a^* e b^* foram variáveis entre as amostras, concluindo-se também que as propriedades dos vinagres eram consideravelmente diferentes.

3.1.2 - Propriedades Bioativas

As propriedades bioativas das amostras dos vinagres de malagueta e de damasco foram avaliadas a partir da determinação dos compostos fenólicos totais, compostos flavonoides totais e atividade antioxidante, cujos resultados estão representados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Propriedades bioativas dos diferentes vinagres.

Vinagres	Parâmetros		
	Compostos fenólicos totais (mg ácido gálico/100 ml)	Compostos flavonoides totais (mg catequina/100 ml)	Atividade antioxidante (DPPH, mg Trolox/100 ml)
Damasco	0,15±0,15	52,79±3,00	0,34±0,01
Malagueta	0,34±0,16	34,34±2,34	0,02±0,01
<i>Teste t de Student</i>	$t = 3,18$ $p = 0,15$	$t = 2,78$ $p = 1,12 \times 10^{-3}$	$t = 3,18$ $p = 5,38 \times 10^{-5}$

Os valores correspondem às médias \pm desvios-padrão das amostras (n = 3). Os resultados do teste *t de Student* para amostras independentes são apresentados como *t* e valor *p*.

O teor de compostos fenólicos totais foi menor nas amostras de vinagre de damasco comparativamente às amostras de vinagre de malagueta, apresentando valores de 0,15±0,15 e 0,34±0,16 mg de ácido gálico/100 ml, respetivamente. Contudo para este parâmetro, em termos estatísticos não se verificaram diferenças significativas entre o vinagre de malagueta e damasco (teste, $t = 3,18$; $p = 0,15$). Contrariamente, o teor de compostos flavonoides totais foi superior no vinagre de damasco em relação ao vinagre de malagueta, apresentando valores de 52,79±3,00 e 34,34±2,34 mg de catequina/100 ml, verificando-se, como tal uma diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos (teste, $t = 2,78$; $p = 1,12 \times 10^{-3}$).

No estudo de Bakir *et al.* (2017), o teor de compostos fenólicos totais e de compostos flavonoides totais dos diferentes vinagres em estudo variaram entre 17±1 e 255±24 mg de ácido gálico/100 ml e 2,4±0,1 e 96±18 mg de catequina/100 ml, respetivamente. Ainda segundo estes autores os valores de compostos fenólicos totais e de compostos flavonoides totais obtidos para as amostras de vinagre de damasco foram

de $5,6\pm 0,2$ mg de ácido gálico/100 ml e 26 ± 1 mg de catequina/100 ml, respetivamente. Como tal constatou-se que o intervalo de valores obtidos no estudo de Bakir *et al.* (2017) para estas propriedades bioativas foi superior comparativamente com os resultados obtidos para os vinagres de damasco e malagueta. No estudo de Ozturk *et al.* (2015), o teor de compostos fenólicos e de flavonoides totais dos vinagres tradicionais e industriais estudados variou entre $0,040\pm 0,003$ e $2,229\pm 0,083$ mg de ácido gálico/ml e $0,011\pm 0,0006$ e $0,349\pm 0,003$ mg de catequina/ml, respetivamente. De acordo com o estudo de Sengun *et al.* (2020), os intervalos de valores obtidos para os compostos fenólicos e flavonoides totais dos diferentes vinagres de frutas estão compreendidos entre $0,933\pm 0,001$ e $1,162\pm 0,001$ mg de ácido gálico/ml e $0,471\pm 0,004$ e $0,067\pm 0,003$ mg de catequina/ml, respetivamente. No caso específico do vinagre de damasco constatou-se que o teor de compostos fenólicos totais foi de $1,005\pm 0,011$ mg de ácido gálico/ml e o teor de compostos flavonoides totais foi de $0,167\pm 0,004$ mg de catequina/ml.

A atividade antioxidante dos vinagres em estudo foi determinada com base no método DPPH, tendo-se obtido para as amostras de vinagre de damasco um resultado de $0,34\pm 0,01$ mg de Trolox/100 ml e para as amostras de vinagre de malagueta um valor de $0,02\pm 0,01$ mg de Trolox/100 ml, ou seja, poderes antioxidantes pequenos. Neste parâmetro, ambos os vinagres são estatisticamente diferentes (teste, $t = 3,18$; $p < 10^{-4}$).

Em Sengun *et al.* (2020), a atividade antioxidante dos vinagres de fruta analisados variou entre $0,047\pm 0,003$ e $0,302\pm 0,006$ μ g Trolox/ml. Segundo o estudo de Bakir *et al.* (2017), os vinagres estudados apresentaram um poder antioxidante com uma grande variância, estando compreendido entre 13 ± 1 e 517 ± 43 mg de Trolox/100 ml.

As discrepâncias encontradas para as propriedades bioativas entre os vinagres de damasco e malagueta e os vinagres dos estudos referenciados anteriormente podem ser explicadas pelo tipo e estado de maturação da matéria-prima utilizada, pela tecnologia de produção empregue ou pelo tempo de envelhecimento dos produtos (Ozturk *et al.*, 2015; Sengun *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2017). Além disso, o baixo poder antioxidante dos vinagres de malagueta e damasco poderá estar diretamente correlacionado com os baixos valores de compostos fenólicos totais obtidos neste estudo (Hammouda *et al.*, 2021).

3.2 - Avaliação da Qualidade Microbiológica dos Vinagres

A qualidade microbiológica dos vinagres em estudo foi avaliada através da enumeração de bactérias acéticas (BA), bactérias ácido-láticas (BAL), leveduras, fungos filamentosos e microrganismos mesófilos aeróbios (MMA).

As amostras testadas dos vinagres de damasco e malagueta não apresentaram crescimento microbiano. A enumeração dos vários grupos microbianos analisados encontrava-se abaixo do limite de detecção, em ambos os vinagres (1 UFC/ml).

De acordo com o estudo de Sengun *et al.* (2020), diversos vinagres de fruta (maçã, ameixa, uva, tangerina, amora, damasco, dióspiro, romã, figo e rosa-mosqueta) produzidos sem pasteurização e aditivos foram estudados quanto às suas propriedades microbianas. As contagens de BAL variaram entre 1,60 e 5,39 log UFC/ml para os vinagres de maçã, figo, ameixa, uva e amora. A enumeração de BA e leveduras/fungos filamentosos variou entre 3,34-6,32 log UFC/ml e 2,53-3,97 log UFC/ml, respetivamente para os vinagres de maçã, figo, ameixa e uva. Contrariamente, para os vinagres de damasco, tangerina, romã e rosa-mosqueta, a contagem de BAL, BA e leveduras/fungos filamentosos encontrou-se abaixo do limite de detecção.

No estudo de Ozturk *et al.* (2015) foram avaliadas as propriedades microbianas de vinte vinagres tradicionais comparativamente a cinco vinagres industriais. Cerca de 52 % das amostras, isto é, nove vinagres tradicionais e quatro vinagres industriais apresentaram valores abaixo do limite de detecção no que diz respeito à enumeração de BAL. Quanto à contagem de BA, oito vinagres tradicionais e cinco vinagres industriais apresentaram valores abaixo do limite de detecção, correspondendo a 52 % das amostras. No que diz respeito à enumeração de leveduras/fungos filamentosos, 64 % das amostras, mais precisamente doze vinagres tradicionais e quatro vinagres industriais, apresentaram valores também abaixo do limite de detecção. Para as restantes amostras os valores de BA foram relativamente superiores aos valores de BAL e leveduras/fungos filamentosos. Em nove amostras de vinagre tradicional (36 % das amostras) foram encontradas juntamente BAL e BA, apresentando contagens que variam entre $2,6 \times 10^3$ - $7,2 \times 10^6$ e $2,5 \times 10^4$ - $1,1 \times 10^9$, respetivamente. Contrariamente, em quatro amostras de vinagre tradicional e três amostras de vinagre industrial (28 % das amostras) não se registou a presença de nenhum dos grupos microbianos testados.

Segundo os autores acima mencionados, o estado microbiológico do vinagre depende de condições intrínsecas, como a composição do meio, e parâmetros extrínsecos,

tais como a temperatura e humidade. O etanol e o ácido produzidos nas etapas iniciais da fermentação alcoólica, sobretudo por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e BAL respetivamente, inibem a proliferação de microrganismos indesejáveis e prolongam o tempo de vida útil do vinagre. Na etapa de acetificação, as BA produzem ácido acético que inibe o crescimento de microrganismos intolerantes a ácidos. No entanto, nos processos naturais pode ocorrer um grande risco de deterioração do vinagre, devido à dificuldade de controlo das etapas de processamento.

No estudo realizado por Sengun (2013) foram estudadas as propriedades microbiológicas de vinagres tradicionais de figo produzidos utilizando várias receitas e diferentes matérias-primas. A enumeração de leveduras das amostras dos oito vinagres em estudo variou entre 0,00 e 6,49 log UFC/ml. Pelo contrário, não se verificou crescimento de fungos filamentosos em todas as amostras. Neste estudo as BAL também foram enumeradas no meio MRS (pH 6,2±0,2) apresentando valores entre 0,81 e 8,20 log UFC/ml. A contagem mais elevada de BAL registou-se na amostra de vinagre mais ácida, pelo que o desenvolvimento deste grupo de microrganismos poderá estar dependente da acidez. Segundo Torija *et al.* (2010) é relatado que as populações de BA apresentam valores elevados de crescimento em amostras de vinagre, como 10⁸ células/ml. Porém, no estudo de Sengun (2013) as contagens de BA são relativamente baixas para a maioria das amostras de vinagre de figo, o que poderá estar relacionado com a quantidade de microbiota que não pode ser cultivada nos meios de cultura padrão. Ainda de acordo com Sengun (2013), o cultivo, isolamento e preservação das BA é relativamente difícil, o que restringe a utilização deste grupo bacteriano como cultura de arranque para a produção de vinagre. Contudo, a utilização de BA como cultura de arranque melhora o processo de acetificação e a qualidade do produto final, pelo que têm sido feitos esforços no sentido de compreender o estado viável, mas não cultivável destes microrganismos em processos naturais.

3.3 - Estudo da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos vinagres de damasco e malagueta foi estudada através da utilização de diferentes culturas teste de bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* (ATCC 10876)), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)), bactérias Gram-negativas (*Cronobacter sakazakii* (ATCC 29544), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028)) e 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), e *Debaryomyces hansenii* (PYCC 2968)).

3.3.1 - Atividade Antibacteriana

O efeito dos vinagres diversos antibióticos contra as bactérias teste utilizadas neste estudo estão representados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Atividade antimicrobiana dos antibióticos contra as bactérias testadas.

		Antibióticos			
Bactérias		Ampicilina	Penicilina	Cloranfenicol	Eritromicina
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	Halo (mm)	39,50	51,50	35,00	24,00
	D	31,11±2,41 $t=-10,45$ $p=6\times 10^{-6}$	$t=-25,4$ $p=6\times 10^{-9}$	$t=-4,85$ $p=1,3\times 10^{-3}$	$t=8,86$ $p=2\times 10^{-5}$
	M	30,67±1,80 $t=-14,7$ $p=5\times 10^{-6}$	$t=-34,67$ $p=5\times 10^{-10}$	$t=-7,21$ $p=9\times 10^{-5}$	$t=11,09$ $p=4\times 10^{-6}$
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	Halo (mm)	28,00	10,00	30,50	-
	D	23,39±2,48 $t=-5,57$ $p=5\times 10^{-4}$	$t=16,17$ $p=2\times 10^{-7}$	$t=-8,59$ $p=3\times 10^{-5}$	-
	M	18,72±2,50 $t=-11,13$ $p=4\times 10^{-6}$	$t=10,46$ $p=6\times 10^{-6}$	$t=-14,13$ $p=6\times 10^{-7}$	-
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Halo (mm)	-	-	10,50	-
	D	40,17±2,72	-	$t=32,77$ $p=8\times 10^{-10}$	-
	M	36,06±3,20	-	$t=23,99$ $p=1\times 10^{-8}$	-
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	Halo (mm)	25,00	-	28,50	-
	D	32±1,66 $t=12,66$ $p=1\times 10^{-6}$	-	$t=6,33$ $p=2\times 10^{-4}$	-
	M	30,89±3,86 $t=4,58$ $p=1,8\times 10^{-3}$	-	$t=1,86$ $p=0,10$	-
<i>B. cereus</i> (ATCC 10876)	Halo (mm)	32,00	12,00	31,50	25,50
	D	23,22±1,73 $t=-15,19$ $p=4\times 10^{-7}$	$t=19,42$ $p=5\times 10^{-8}$	$t=-14,32$ $p=5,52\times 10^{-7}$	$t=3,94$ $p=4,3\times 10^{-3}$
	M	31±2,38 $t=-1,26$ $p=0,24$	$t=23,90$ $p=1\times 10^{-8}$	$t=-0,63$ $p=0,55$	$t=6,92$ $p=1\times 10^{-4}$
<i>C. sakazakii</i> (ATCC 29544)	Halo (mm)	28,50	7,50	28,00	-
	D	26,39±1,51 $t=-4,21$ $p=3\times 10^{-3}$	$t=37,65$ $p=3\times 10^{-10}$	$t=-3,21$ $p=0,012$	-
	M	25,11±0,78 $t=-13,01$ $p=1\times 10^{-6}$	$t=67,59$ $p=3\times 10^{-12}$	$t=-11,09$ $p=4\times 10^{-6}$	-
<i>L. innocua</i> (ATCC 33090)	Halo (mm)	37,50	39,50	34,00	24,00
	D	28,83±3,14 $t=-8,27$ $p=3\times 10^{-5}$	$t=-10,18$ $p=7\times 10^{-6}$	$t=-4,93$ $p=1,1\times 10^{-3}$	$t=4,61$ $p=1,7\times 10^{-3}$
	M	27±5,06 $t=-6,22$ $p=3\times 10^{-4}$	$t=-7,41$ $p=8\times 10^{-5}$	$t=-4,15$ $p=3,2\times 10^{-3}$	$t=1,78$ $p=0,11$
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	Halo (mm)	35,00	28,50	47,00	27,50
	D	25±2,32 $t=-12,94$ $p=1\times 10^{-6}$	$t=-4,53$ $p=1,9\times 10^{-3}$	$t=-28,47$ $p=3\times 10^{-9}$	$t=-3,24$ $p=0,01$
	M	26,89±3,62 $t=-6,72$ $p=1\times 10^{-4}$	$t=-1,34$ $p=0,22$	$t=-16,66$ $p=2\times 10^{-7}$	$t=-0,51$ $p=0,63$

Os valores correspondem às médias \pm desvios-padrão dos halos inibitórios (mm), em que (-) representa a ausência de halo ($n=3$). Os resultados do teste *t* de Student para amostras independentes de vinagre de damasco, vinagre de malagueta e os respectivos antibióticos testados são apresentados como *t* e valor *p*. D* corresponde ao vinagre de damasco e M* ao vinagre de malagueta.

O antibiótico ampicilina inibiu com maior eficácia o desenvolvimento de *S. aureus* (39,50 mm) e com menor eficácia o crescimento de *E. coli* (25,00 mm), pois induziu halos inibitórios mais pequenos (Figura 3.1).

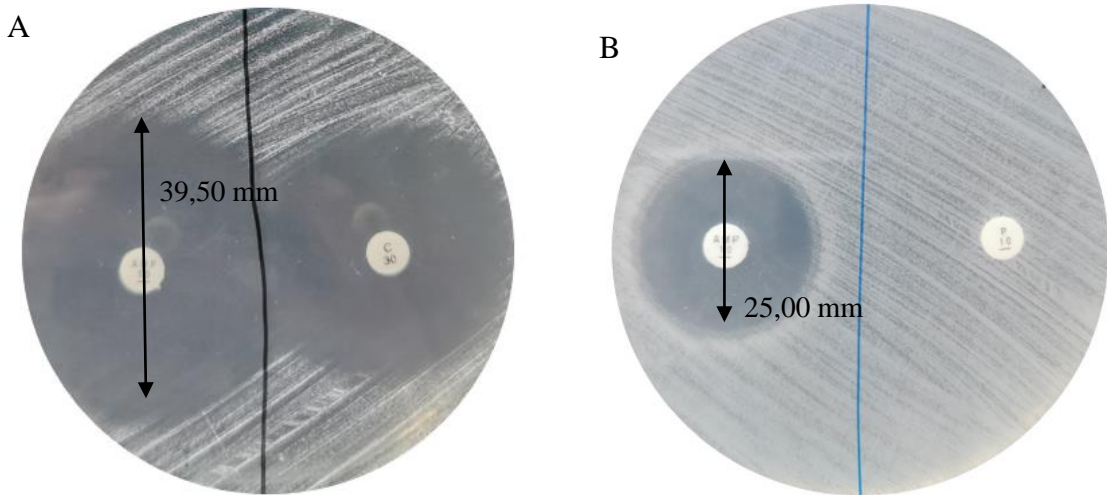


Figura 3.1 - Efeito da ampicilina em *S. aureus* (A) e *E. coli* (B).

O antibiótico penicilina foi o antibiótico que apresentou maior eficácia contra a bactéria *S. aureus* (51,50 mm) e *L. innocua* (39,50 mm). Contudo, para *B. cereus* (12,00 mm) e *C. sakazakii* (7,50 mm) induziu halos inibitórios pequenos e no caso da *P. aeruginosa* e *E. coli* não formou halos, não inibindo o crescimento destas bactérias (Figura 3.2).

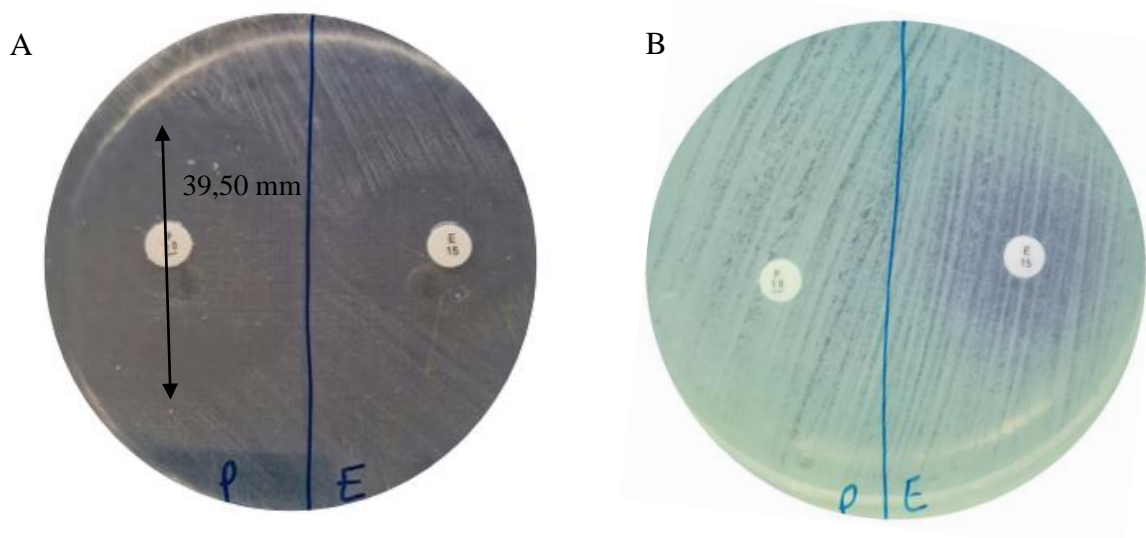


Figura 3.2 - Efeito da penicilina em *L. innocua* (A) e *P. aeruginosa* (B).

O cloranfenicol foi o antibiótico que inibiu com maior eficácia o crescimento de *S. epidermidis* (47,00 mm), porém para a bactéria *P. aeruginosa* induziu halos inibitórios pequenos (10,50 mm) (Figura 3.3).

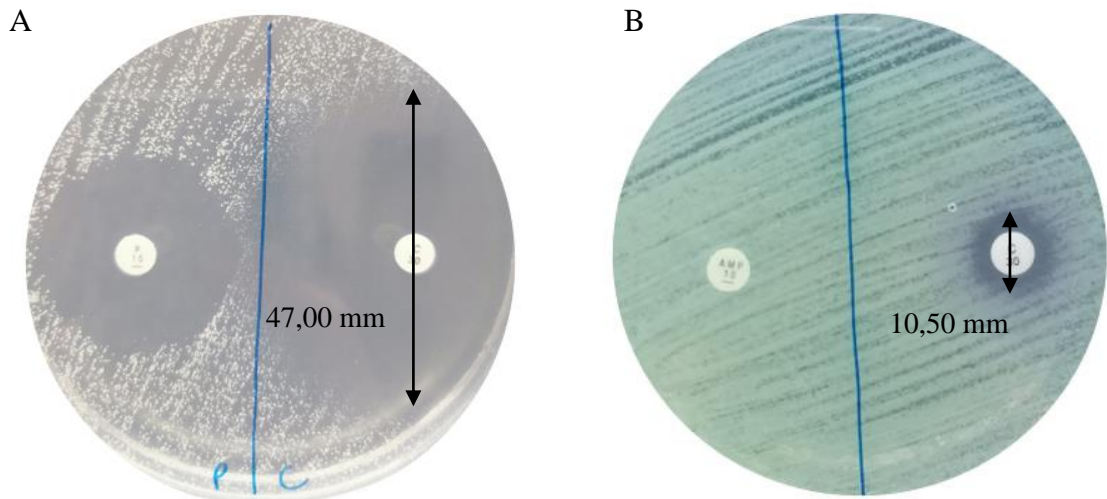


Figura 3.3 - Efeito do cloranfenicol em *S. epidermidis* (A) e *P. aeruginosa* (B).

O antibiótico eritromicina não apresentou eficácia contra o crescimento das bactérias *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. sakazakii*, apresentando os maiores halos de inibição para *S. epidermidis* (27,50 mm) e *B. cereus* (25,50 mm) (Figura 3.4).

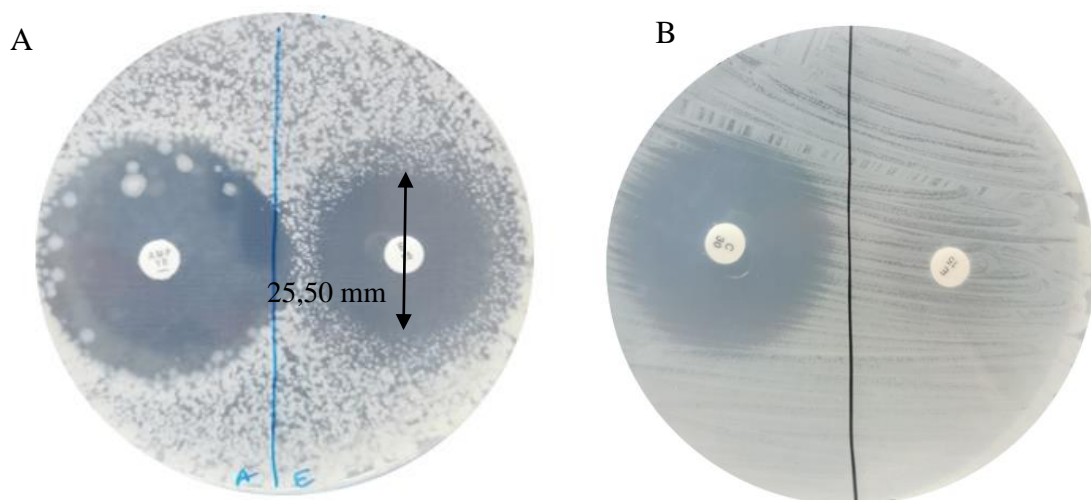


Figura 3.4 - Efeito da eritromicina em *B. cereus* (A) e *S. Typhimurium* (B).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo (Tabela 3.4) verifica-se que as bactérias *S. aureus* e *L. innocua* são mais sensíveis aos antibióticos ampicilina e penicilina e apresentam maior resistência à eritromicina. A penicilina produziu o maior halo de todos os ensaios contra a espécie *S. aureus* ($51,50 \pm 0,00$ mm). Além disso, as bactérias *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. sakazakii* apresentaram sensibilidade ao antibiótico cloranfenicol e resistência à eritromicina, enquanto que as bactérias *S. epidermidis* e *B. cereus* foram menos tolerantes à ampicilina e cloranfenicol. A *P. aeruginosa* apresentou resistência a todos os antibióticos, com exceção do cloranfenicol.

O efeito dos vinagres em estudo contra as bactérias teste utilizadas estão representados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Atividade antimicrobiana dos vinagres contra as bactérias testadas.

Bactérias	Vinagres [diâmetro dos halos (mm)]	
	Damasco	Malagueta
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	31,11±2,41	30,67±1,80
	$t=2,11$	$p=0,66$
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	23,39±2,48	18,72±2,50
	$t=2,11$	$p=1,10 \times 10^{-3}$
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	40,17±2,72	36,06±3,10
	$t=2,11$	$p=9,60 \times 10^{-3}$
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	32,00±1,66	30,89±3,86
	$t=2,20$	$p=0,44$
<i>B. cereus</i> (ATCC 10876)	23,22±1,73	31,00±2,38
	$t=2,13$	$p=9,85 \times 10^{-7}$
<i>C. sakazakii</i> (ATCC 29544)	26,39±1,51	25,11±0,78
	$t=2,18$	$p=0,05$
<i>L. innocua</i> (ATCC 33090)	28,83±3,14	27,00±5,06
	$t=2,16$	$p=0,37$
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	25,00±2,31	26,89±3,62
	$t=2,15$	$p=0,21$

Os valores correspondem às médias \pm desvios-padrão dos halos inibitórios (mm) n ($n=3$). Os resultados do teste t de Student para amostras independentes de vinagre de damasco e vinagre de malagueta são apresentados como t e valor p .

Os resultados da atividade antibacteriana dos vinagres de damasco e malagueta (Tabela 3.5) revelaram uma capacidade de inibição significativa contra as diversas bactérias testadas. As amostras de vinagre de damasco, que possuem uma percentagem de acidez superior ($7,33\pm 0,05$ g/100 ml de ácido acético) relativamente ao vinagre de malagueta ($6,09\pm 0,15$ g/100 ml de ácido acético), induziram em geral a formação de halos de inibição com diâmetros superiores, demonstrando, portanto, uma maior atividade antibacteriana.

O vinagre de damasco induziu os maiores halos de inibição nas espécies *P. aeruginosa* ($40,17\pm 2,72$ mm) (Figura 3.5-A), *E. coli* ($32,00\pm 1,66$ mm) e *S. aureus* ($31,11\pm 2,41$ mm). As bactérias menos sensíveis a este vinagre foram as espécies *B. cereus* ($23,22\pm 1,70$ mm) (Figura 3.5-B), *S. Typhimurium* ($23,39\pm 2,48$ mm) e *S. epidermidis* ($25,00\pm 2,31$ mm).

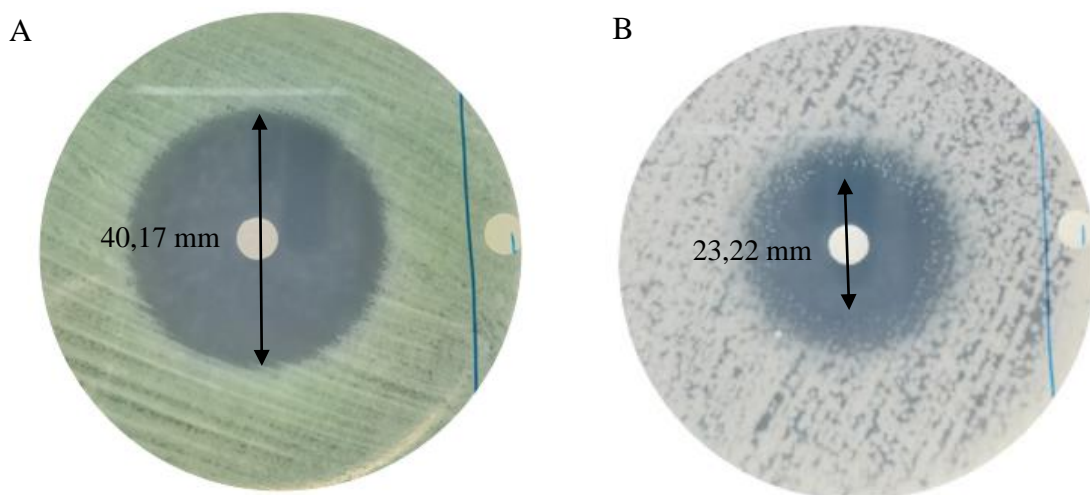


Figura 3.5 - Efeito do vinagre de damasco em *P. aeruginosa* (A) e *B. cereus* (B).

O vinagre de malagueta provocou uma forte inibição do crescimento de *P. aeruginosa* ($36,06\pm 3,10$ mm) (Figura 3.6-A), *B. cereus* ($31,00\pm 2,38$ mm) e *E. coli* ($30,89\pm 3,86$ mm). As bactérias *S. Typhimurium* ($18,72\pm 2,50$ mm) (Figura 3.6-B), *C. sakazakii* ($25,11\pm 0,78$ mm) e *S. epidermidis* foram as mais tolerantes a este vinagre.

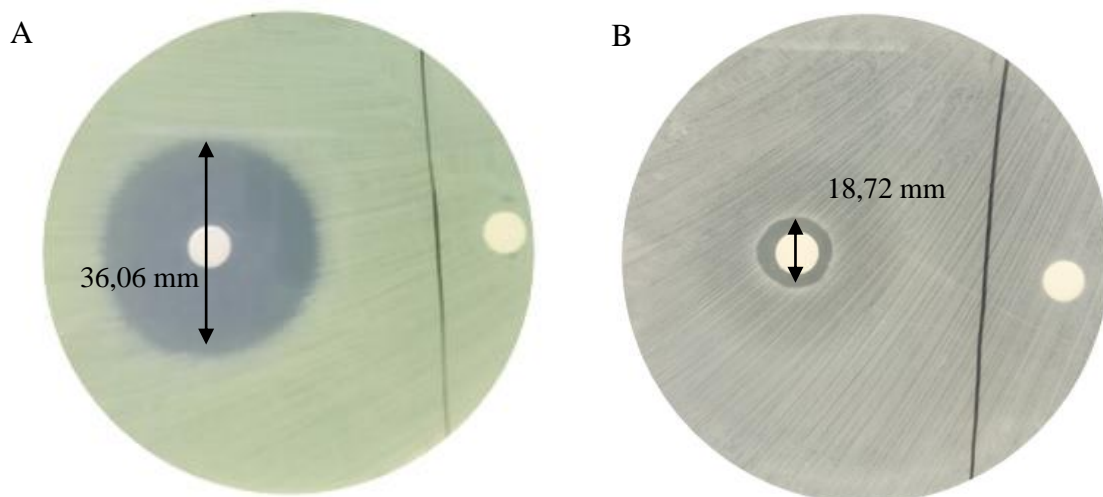


Figura 3.6 - Efeito do vinagre de damasco em *P. aeruginosa* (A) e *S. Typhimurium* (B).

A espécie *S. aureus* foi a bactéria Gram-positiva mais fortemente inibida pelo vinagre de damasco ($31,11 \pm 2,41$ mm), contudo não se verificou uma diferença estatisticamente significativa na ação de ambos os vinagres contra este microrganismo (teste, $t = 2,11$; $p = 0,66$). Relativamente à eficácia de cada um dos antibióticos ampicilina, penicilina, cloranfenicol e eritromicina em comparação com os vinagres de damasco ($p < 10^{-4}$) e malagueta ($p < 10^{-4}$) verificaram-se diferenças significativas.

A *S. Typhimurium* não foi inibida em níveis semelhantes (teste, $t = 2,11$; $p = 1,10 \times 10^{-3}$) pelos vinagres de damasco e de malagueta, que potenciaram a formação de alguns dos menores halos de inibição, obtidos no estudo, com diâmetros de $23,39 \pm 2,48$ mm e $18,72 \pm 2,50$ mm, respetivamente. No caso da capacidade antibacteriana dos antibióticos ampicilina, penicilina e cloranfenicol em comparação com o vinagre de damasco (ampicilina: teste, $t = -5,57$; $p = 5 \times 10^{-4}$ / penicilina: teste, $t = 16,17$; $p < 10^{-4}$ / cloranfenicol: teste, $t = -8,59$; $p < 10^{-4}$) e malagueta ($p < 10^{-4}$) verificaram-se diferenças significativas.

A espécie *P. aeruginosa* foi a bactéria que apresentou maior sensibilidade em relação aos vinagres de damasco e malagueta, tendo formado halos de inibição com diâmetros de $40,17 \pm 2,72$ mm e $36,06 \pm 3,10$ mm, havendo diferenças significativas entre estes valores (teste, $t = 2,11$; $p = 9,60 \times 10^{-3}$). O antibiótico cloranfenicol foi o único eficaz contra o crescimento desta espécie, verificando-se uma diferença significativa da sua ação em comparação com os vinagres de damasco e malagueta ($p < 10^{-4}$).

A espécie *E. coli* foi a segunda bactéria Gram-negativa mais fortemente inibida pelos vinagres de damasco e malagueta, que desencadearam a formação de halos de inibição de $32,00 \pm 1,66$ mm e $30,89 \pm 3,86$ mm, respectivamente, não se observando, contudo, uma diferença significativa entre os valores (teste, $t = 2,20$; $p = 0,44$). Os antibióticos ampicilina e cloranfenicol foram os únicos que inibiram o crescimento desta bactéria e apresentaram diferenças significativas em comparação com os vinagres, com exceção do cloranfenicol e o vinagre de malagueta, que inibiram o seu desenvolvimento de forma semelhante (teste, $t=1,86$; $p=0,10$).

O vinagre de malagueta foi o que melhor inibiu o crescimento de *B. cereus* ($31,00 \pm 2,38$ mm), verificando-se uma diferença estatisticamente significativa (teste, $t = 2,13$; $p < 10^{-4}$) no nível de inibição de ambos os vinagres para esta bactéria. Quanto aos antibióticos, somente se verificou uma semelhança na capacidade de inibição do crescimento da espécie entre a ampicilina e o vinagre de malagueta (teste, $t = -1,26$; $p = 0,24$) e entre o cloranfenicol e o vinagre de malagueta (teste, $t = -0,63$; $p = 0,55$).

Os vinagres de damasco e malagueta inibiram o crescimento de *C. sakazakii* de forma semelhante, pois não existem diferenças estatisticamente significativas entre os diâmetros dos halos de inibição obtidos (teste, $t = 2,18$; $p = 0,05$). Todos os antibióticos, com exceção da eritromicina impediram o crescimento deste microrganismo, tendo-se verificado diferenças significativas no desempenho de cada um deles comparativamente aos vinagres de damasco (ampicilina: teste, $t = -4,21$; $p = 3 \times 10^{-3}$ / penicilina: teste, $t = 37,65$; $p < 10^{-4}$ / cloranfenicol: teste, $t = -3,21$; $p = 0,01$) e malagueta (ampicilina: teste, $t = -13,01$; $p = 3 \times 10^{-6}$ / penicilina: teste, $t = 37,59$; $p < 10^{-4}$ / cloranfenicol: teste, $t = -11,09$; $p < 10^{-4}$).

A espécie *L. innocua* foi inibida de forma semelhante pelos vinagres de damasco ($28,83 \pm 3,14$ mm) e malagueta ($27,00 \pm 5,06$ mm), pois não se verificaram diferenças significativas (teste, $t = 2,16$; $p = 0,37$) nos diâmetros dos halos de inibição formados. Contudo, o antibiótico eritromicina e o vinagre de malagueta desencadearam um efeito semelhante na inibição do desenvolvimento desta bactéria, pois os resultados obtidos não são estatisticamente diferentes (teste, $t = 1,78$; $p = 0,11$).

Constatou-se também que ambos os vinagres de damasco e malagueta inibiram o crescimento de *S. epidermidis*, com formação de halos com diâmetros de $25,00 \pm 2,31$ mm e $26,89 \pm 3,62$ mm, valores estes estatisticamente semelhantes (teste, $t = 2,15$; $p = 0,21$). Além disso, todos os antibióticos testados interferiram no crescimento da espécie, mas apenas se verificou uma semelhança na capacidade antibacteriana entre o antibiótico

penicilina e o vinagre de malagueta (teste, $t = -1,34$; $p = 0,22$) e entre o antibiótico eritromicina e os vinagres de malagueta (teste, $t = -0,51$; $p = 0,63$).

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 3.4 e 3.5, os vinagres de damasco ($31,11 \pm 2,41$ mm) e malagueta ($30,67 \pm 1,80$ mm) induziram a formação de halos de inibição para a espécie *S. aureus* com diâmetros inferiores aos induzidos pelos controlos positivos (ampicilina: 39,50 mm; penicilina: 51,50 mm; e cloranfenicol: 35,00 mm), com exceção da eritromicina (24,00 mm). Relativamente a *S. Typhimurium*, os vinagres de damasco e malagueta também induziram a formação de halos de inibição com diâmetros inferiores aos induzidos pelos antibióticos ampicilina e cloranfenicol, com exceção da penicilina (10 mm) e eritromicina (sem formação de halo). No caso da espécie *P. aeruginosa*, ambos os vinagres de damasco ($40,17 \pm 2,72$ mm) e malagueta ($36,06 \pm 3,10$ mm) apresentam uma atividade antimicrobiana muito superior em relação a todos os antibióticos testados (ampicilina, penicilina e eritromicina: sem formação de halos; cloranfenicol: 10,50 mm). Quanto à espécie *E. coli*, apenas os antibióticos ampicilina (25 mm) e cloranfenicol (28,50 mm) provocaram inibição do seu crescimento, contudo os halos de inibição formados foram inferiores aos halos induzidos pela ação dos vinagres de damasco ($32,00 \pm 1,66$ mm) e malagueta ($30,89 \pm 3,86$). Relativamente à espécie *B. cereus*, o vinagre de damasco apresentou uma atividade antimicrobiana inferior aos controlos positivos (ampicilina: 32,00 mm; cloranfenicol: 31,50 mm; eritromicina: 25,50 mm), com exceção da penicilina (12,00 mm) e o vinagre malagueta ($31,00 \pm 2,38$ mm) apresentou uma atividade antimicrobiana superior à penicilina e eritromicina e inferior à ampicilina e cloranfenicol. A espécie *C. sakazakii* apresentou maior sensibilidade aos antibióticos ampicilina (28,50 mm) e cloranfenicol (28,00 mm), comparativamente aos vinagres testados (damasco: $26,39 \pm 1,51$ mm; malagueta: $25,11 \pm 0,78$ mm). No entanto, os vinagres de damasco e malagueta apresentaram uma atividade antimicrobiana superior à penicilina (7,50 mm) e eritromicina (sem formação de halo). A espécie *L. innocua* apresentou maior sensibilidade aos controlos positivos testados (ampicilina: 37,50 mm; penicilina: 39,50 mm; cloranfenicol: 34,00 mm), com exceção do antibiótico eritromicina (24,00 mm) e menos tolerante aos vinagres de damasco ($28,83 \pm 3,14$) e malagueta ($27,00 \pm 5,06$ mm). Todos os antibióticos apresentaram uma atividade antimicrobiana superior (ampicilina: 35,00 mm; penicilina: 28,50 mm; cloranfenicol: 47,00 mm; eritromicina: 27,50 mm) aos vinagres testados (damasco: $25,00 \pm 2,31$ mm; malagueta: $26,89 \pm 3,62$) para a espécie *S. epidermidis*.

São vários os estudos que descrevem a atividade antimicrobiana de vinagres resultantes de diferentes matérias-primas. No estudo de Hammouda *et al.* (2021), foram analisados quatro tipos de vinagres tradicionais (uva, figo da Índia, figo e tâmara) provenientes de diferentes regiões da Tunísia, quanto à sua atividade antibacteriana contra três bactérias Gram-positivas, nomeadamente *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* e uma Gram-negativa, a *E. coli*, utilizando o método de difusão em agar. Os diâmetros dos halos de inibição obtidos variaram entre $15,5 \pm 0,71$ mm e $24 \pm 1,42$ mm para *S. aureus*; $11 \pm 1,42$ mm e $17 \pm 1,42$ mm para *E. faecalis*; $14,5 \pm 0,71$ mm e $19 \pm 1,42$ mm para *L. monocytogenes*; e $10 \pm 1,42$ e $23 \pm 1,42$ para *E. coli*. A atividade antimicrobiana destes vinagres contra *S. aureus* e *E. coli* foi inferior à atividade antimicrobiana obtida para estas espécies no presente estudo (Tabela 3.5). De acordo com o autor, a acidez característica deste tipo de produtos, cujo pH está compreendido entre 3,61 e 4,08, e o seu conteúdo em compostos fenólicos são responsáveis por promover a sua atividade antimicrobiana.

Ozturk *et al.* (2015) estudou a atividade antimicrobiana de vinte vinagres tradicionais (uva, maçã, alcachofra, limão, espinheiro) e cinco vinagres industriais (uva, maçã, limão, cereja e romã) provenientes de várias cidades da Turquia, através do método de difusão em agar contra dez microrganismos (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Proteus vulgaris*). A sensibilidade das bactérias aos diversos vinagres foi bastante variável e no caso específico dos vinagres produzidos de forma artesanal foram registados halos de inibição com diâmetros compreendidos entre $30,71 \pm 5,66$ mm e $6,83 \pm 0,47$ mm. Cinco vinagres tradicionais conseguiram inibir o crescimento de *E. coli*, tendo induzido halos com diâmetros que variaram entre $8,54 \pm 0,42$ mm e $11,24 \pm 1,25$ mm. No caso da estirpe *E. coli* O157:H7, seis vinagres tradicionais inibiram o seu crescimento, com a formação de halos compreendidos entre $7,56 \pm 0,52$ mm e $15,16 \pm 4,71$ mm. No presente estudo os valores dos halos obtidos para *E. coli* foram superiores. As bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. cereus* apresentaram halos de inibição derivados da ação de determinados vinagres tradicionais a variar entre $7,64 \pm 0,40/20,12 \pm 0,28$ mm e $7,37 \pm 0,79/23,56 \pm 0,82$ mm, respetivamente. Estes resultados estão em concordância com os valores obtidos no presente estudo para *B. cereus* relativamente à atividade antibacteriana do vinagre de damasco. O crescimento das bactérias Gram-negativas *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* foi inibido pela ação de alguns dos vinagres tradicionais, sendo que o diâmetro dos halos formados variou entre

7,21±0,74/11,96±1,18 mm e 6,18±0,18/14,71±0,70 mm, respectivamente. Contrariamente, no presente estudo os diâmetros dos halos formados para *P.aeruginosa* por ação do vinagre de damasco e malagueta foram muito superiores (vinagre de damasco: 40,17±2,72 mm; vinagre de malagueta: 36,06±3,10 mm).

No estudo de Bakir *et al.* (2017) dezoito vinagres (maçã, uva, romã, balsâmico, amora, mirtilo, alcachofra, limão, rosa-mosqueta, espinheiro, damasco e arroz) mostraram atividade antibacteriana, tendo potenciado a formação de halos de inibição compreendidos entre 9±1 mm e 14±1 mm para *S. Typhimurium*, 9±1 mm e 13±1 mm para *S. aureus* e 9±1 mm e 14±3 mm para *E. coli*. O vinagre de damasco inibiu com maior eficácia as bactérias *S. aureus* (12±3 mm) e *E. coli* (12±2 mm), apresentando menores halos de inibição para a espécie *S. Typhimurium* (10±2 mm), tendo-se verificado a mesma tendência no presente caso de estudo (Tabela 3.3).

Em Karaagac *et al.* (2016) foi estudada a atividade antibacteriana de um vinagre de amora, o qual foi testado contra oito bactérias (*S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora* e *E. coli*). De acordo com os resultados, o maior halo de inibição foi obtido para *S. aureus*, cujo valor foi de 28 mm, apresentando semelhanças com o presente estudo em que se obteve valores de halos de inibição a variar entre 30,67±1,80 mm e 31,11±2,41 mm para esta bactéria. O vinagre de amora também potenciou o desenvolvimento de halos de inibição de 15,3 mm para *B. cereus* e 5,3 mm para *E. coli*. Os valores dos halos de inibição do crescimento dos microrganismos em análise obtidos pelos autores mencionados foram de forma geral inferiores aos verificados no presente estudo.

Os estudos mencionados referem que a atividade antimicrobiana dos vinagres está relacionada com os valores de pH e o conteúdo de ácido acético e compostos fenólicos destes produtos. Os ácidos orgânicos fracos, como o ácido acético têm a capacidade de penetrar as membranas celulares das bactérias, libertando prótons H⁺, o que provoca uma diminuição do pH intracelular, desencadeando uma destabilização da atividade fisiológica no citoplasma e na membrana com consequente morte celular (Ozturk *et al.*, 2015).

3.3.2- Atividade Antifúngica

O efeito dos vinagres em estudo e dos diversos antimicóticos contra as leveduras teste utilizadas estão representados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Atividade antimicrobiana dos antimicóticos contra as leveduras testadas.

Leveduras		Antimicóticos			
		Nistatina	Anfotericina B	Fluconazol	
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	Halo (mm)	16,50	16,50	29,50	
	D	8,56±0,68	$t=-34,94$ $p=5\times 10^{-10}$	$t=-34,94$ $p=5\times 10^{-10}$	$t=-92,12$ $p=2\times 10^{-13}$
	M	8,11±0,70	$t=-36,1$ $p=4\times 10^{-10}$	$t=-36,1$ $p=4\times 10^{-10}$	$t=-92,03$ $p=2\times 10^{-13}$
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	Halo (mm)	28,00	21,50	---	
	D	-	-	-	-
	M	-	-	-	-
<i>C. neoformans</i> (YPO 186)	Halo (mm)	25,50	12,50	16,50	
	D	12,17±1,44	$t=-27,85$ $p=3\times 10^{-9}$	$t=-0,70$ $p=0,51$	$t=-9,05$ $p=2\times 10^{-5}$
	M	13,17±1,87	$t=-19,78$ $p=4\times 10^{-8}$	$t=1,07$ $p=0,32$	$t=-5,35$ $p=7\times 10^{-4}$
<i>D. hansenii</i> (PYCC 2968)	Halo (mm)	9,50	---	45,00	
	D	12,61±1,14	$t=8,19$ $p=4\times 10^{-5}$	-	$t=-85,22$ $p=4\times 10^{-13}$
	M	11,39±1,08	$t=1,74$ $p=0,12$	-	$t=-31,03$ $p=1\times 10^{-9}$
<i>S. cerevisiae</i> (PYCC 3507)	Halo (mm)	23,50	8,50	17,00	
	D	-	-	-	-
	M	-	-	-	-
<i>P. membranifaciens</i> (PYCC 2489)	Halo (mm)	24,50	---	7,50	
	D	-	-	-	-
	M	-	-	-	-
<i>Z. bailii</i> (PYCC 4806)	Halo (mm)	23,00	10,50	---	
	D	-	-	-	-
	M	-	-	-	-

Os valores correspondem às médias \pm desvios-padrão dos halos inibitórios (mm), em que (---) representa a ausência de halo ($n = 3$). Os resultados do teste t de Student para amostras independentes de vinagre de damasco, vinagre de malagueta e os respectivos antimicóticos testados são apresentados como t e valor p . D* corresponde ao vinagre de damasco e M* ao vinagre de malagueta.

A nistatina foi o antimicótico que inibiu com maior eficácia o crescimento de *C. albicans* (ATCC 10231; 28,00 mm) e *C. neoformans* (25,00 mm) e com menor eficácia as leveduras *D. hansenii* (9,50 mm) e *C. albicans* (ATCC 90028; 16,50 mm), pois induziu halos inibitórios mais pequenos (Figura 3.7).

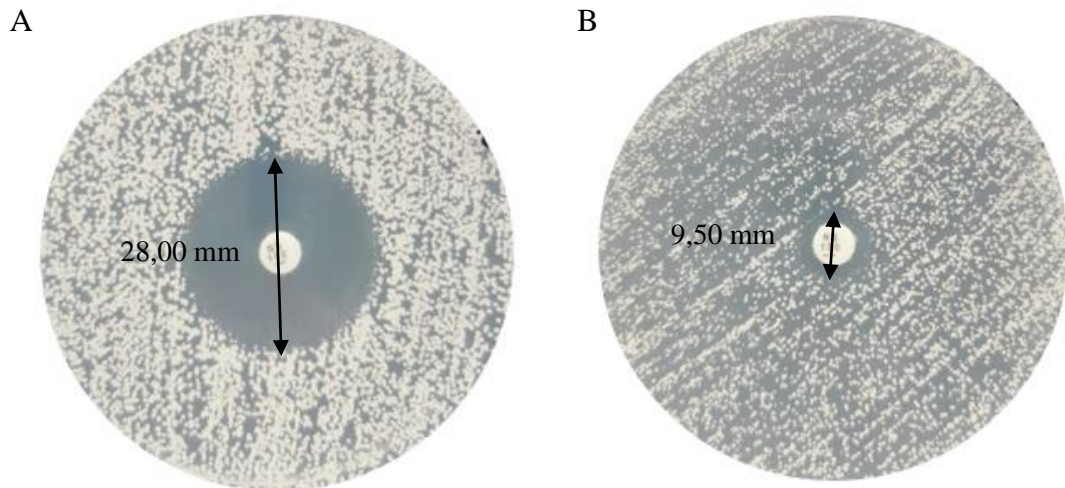


Figura 3.7 - Efeito da nistatina em *C. albicans* (ATCC 10231) (A) e *D. hansenii* (B).

A anfotericina B foi o antimicótico que induziu halos inibitórios com menores dimensões, como no caso de *S. cerevisiae* (8,50 mm) e *Z. bailii* (10,50 mm), não apresentando, contudo, qualquer eficácia contra as leveduras *D. hansenii* e *P. membranifaciens* (Figura 3.8-B). A levedura que apresentou maior sensibilidade foi *C. albicans* (ATCC 10231; 21,50 mm) (Figura 3.8-A).

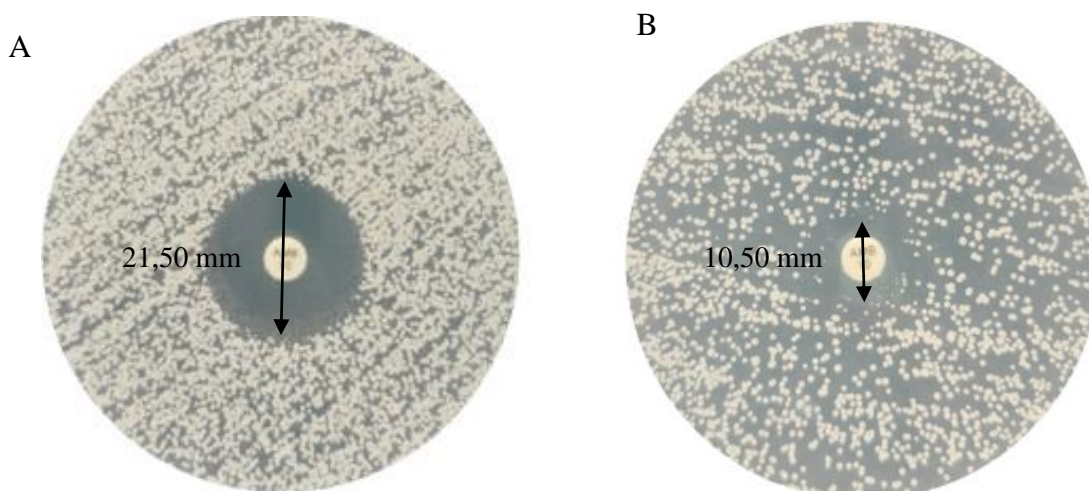


Figura 3.8 - Efeito da anfotericina B em *C. albicans* (ATCC 10231) (A) e *Z. bailii* (B).

O antimicótico fluconazol foi o antimicótico que mostrou maior eficácia contra a levedura *D. hansenii* (45,00 mm) (Figura 3.9-A), seguida da *C. albicans* (ATCC 90028; 29,50 mm). Pelo contrário para *C. neoformans* (16,50 mm) e *S. cerevisiae* (17,00 mm) induziu halos inibitórios mais pequenos e não induziu a formação de halos inibitórios no caso das leveduras *C. albicans* (ATCC 10231) e *Z. bailii*.

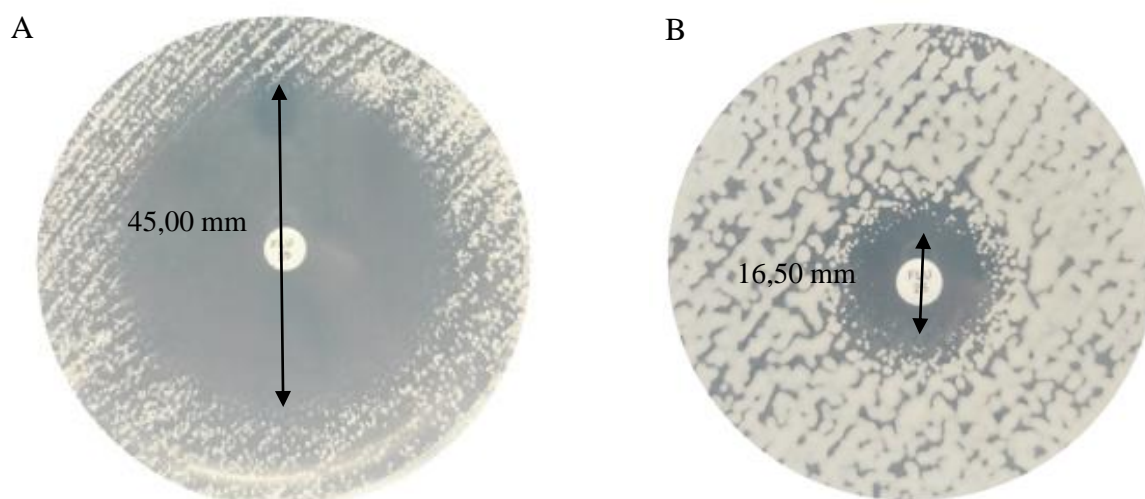


Figura 3.9 - Efeito do fluconazol em *D. hansenii* (A) e *C. neoformans* (B).

O efeito dos vinagres em estudo contra as leveduras teste utilizadas estão representados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Atividade antimicrobiana dos vinagres contra as leveduras testadas.

Leveduras	Vinagres [diâmetro dos halos (mm)]	
	Damasco	Malagueta
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	8,56±0,68	8,11±0,70
	<i>t</i> =2,13	<i>p</i> =0,27
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	---	---
	-	-
<i>C. neoformans</i> (YPO 186)	12,17±1,44	13,17±1,88
	<i>t</i> =2,12	<i>p</i> =0,22
<i>D. hansenii</i> (PYCC 2968)	12,61±1,14	11,39±1,08
	<i>t</i> =2,12	<i>p</i> =0,03
<i>S. cerevisiae</i> (PYCC 3507)	---	---
	-	-
<i>P. membranifaciens</i> (PYCC 2489)	---	---
	-	-
<i>Z. bailii</i> (PYCC 4806)	---	---
	-	-

Os valores correspondem às médias ± desvios-padrão dos halos inibitórios (mm), em que (---) representa a ausência de halo (*n* = 3). Os resultados do teste *t* de *Student* para amostras independentes de vinagre de damasco e vinagre de malagueta são apresentados como *t* e valor *p*.

De acordo com os resultados das Tabelas 3.6 e 3.7 verifica-se que os vinagres em estudo apresentaram uma capacidade de inibição do crescimento de leveduras muito inferior comparativamente aos níveis de inibição causados nas bactérias. Conclui-se, portanto, que as leveduras testadas são menos sensíveis aos vinagres comparativamente às bactérias. O vinagre de damasco induziu os maiores halos de inibição em *D. hansenii* (12,61±1,14 mm) (Figura 3.10-A) e *C. neoformans* (12,17±1,44 mm). Os menores halos de inibição para este vinagre foram detetados na espécie *C. albicans* (ATCC 90028; 8,56±0,68 mm) (Figura 3.10- B). O vinagre de malagueta também induziu os maiores halos de inibição em *C. neoformans* (13,17±1,88 mm) (Figura 3.11-A) e *D. hansenii*

(11,39±1,08 mm), assim como os menores halos de inibição em *C. albicans* (ATCC 90028; 8,11±0,70 mm) (Figura 3.11-B). As leveduras *C. albicans* (ATCC 10231), *S. cerevisiae*, *Z. bailii* e *P. aeruginosa* não apresentaram halos de inibição, pelo que são consideradas microrganismos resistentes aos vinagres de damasco e malagueta.

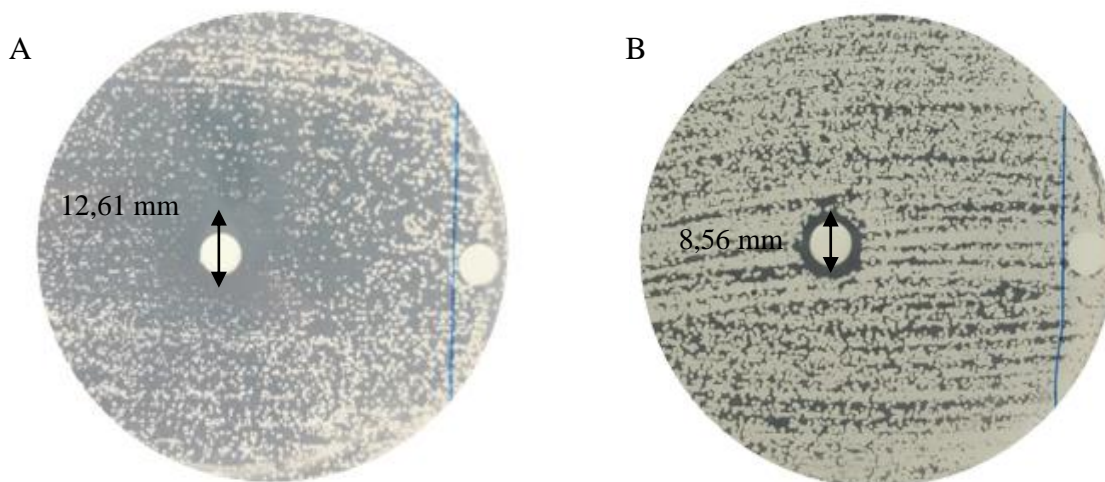


Figura 3.10 - Efeito do vinagre de damasco em *D. hansenii* (A) e *C. albicans* (ATCC 90028) (B).

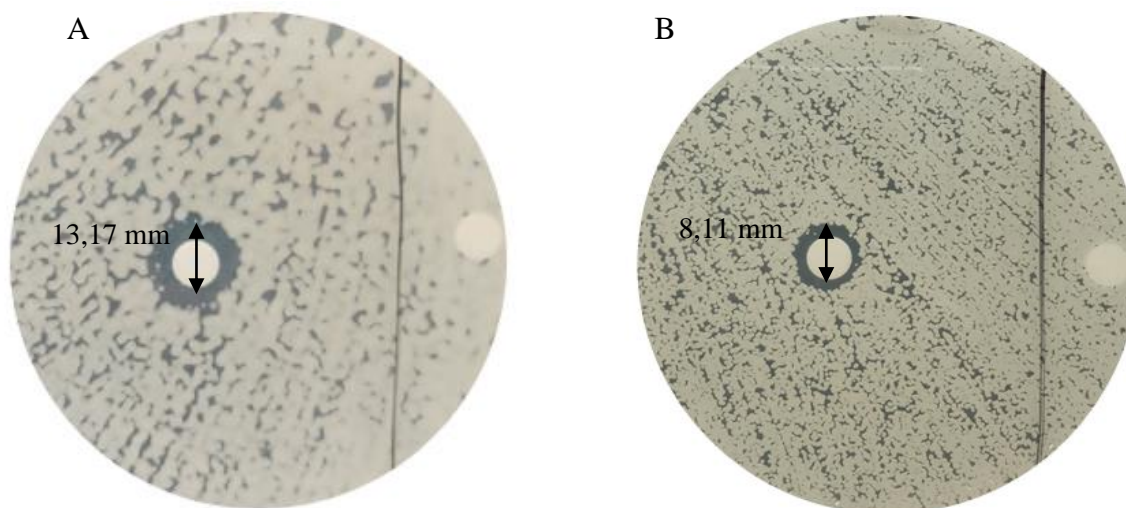


Figura 3.11 - Efeito do vinagre de malagueta em *C. neoformans* (A) e *C. albicans* (ATCC 90028) (B).

Quanto à levedura *C. albicans* (ATCC 90028) esta sofreu uma inibição muito fraca por parte dos vinagres de damasco e malagueta, não se verificando uma diferença significativa na capacidade antifúngica de ambos os vinagres (teste, $t = 2,13$; $p = 0,27$).

Analisando os valores de teste *t de Student* da Tabela 3.6 verifica-se que a capacidade antifúngica dos antimicóticos nistatina, anfotericina B e fluconazol relativamente aos vinagres de damasco e malagueta apresentou uma diferença estatística significativa ($p < 10^{-4}$).

No caso de *C. neoformans*, um dos microrganismos que apresentou maiores halos de inibição, não se verificou uma diferença significativa relativamente à capacidade inibitória dos vinagres de damasco e malagueta (teste, $t = 2,12$; $p = 0,22$) e entre o antimicótico anfotericina B e ambos os vinagres (damasco: teste, $t = 0,70$; $p = 0,51$ / malagueta: teste, $t = 1,07$; $p = 0,32$). Pelo contrário, verificou-se uma diferença significativa no nível de inibição do crescimento da levedura entre o antimicótico nistatina e fluconazol comparativamente aos vinagres de damasco (nistatina: teste, $t = -27,85$; $p < 10^{-4}$ / fluconazol: teste, $t = -9,05$; $p < 10^{-4}$) e malagueta (nistatina: teste, $t = -19,78$; $p < 10^{-4}$ / fluconazol: teste, $t = 5,35$; $p < 10^{-4}$).

Para *D. hansenii* verificou-se uma diferença estatística significativa na capacidade antifúngica entre os vinagres (teste, $t = 2,12$; $p = 0,03$), entre o fluconazol e os vinagres de damasco (teste, $t = -85,22$; $p < 10^{-4}$) e malagueta (teste, $t = 31,03$; $p < 10^{-4}$) e entre a nistatina e o vinagre de damasco (teste, $t = 8,19$; $p < 10^{-4}$). Contudo, não se constatou uma diferença estatística significativa entre a nistatina e o vinagre de malagueta (teste, $t = 1,74$; $p = 0,11$). De forma geral, os vinagres causaram inibições inferiores comparativamente aos antimicóticos testados.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 3.6 e 3.7 verifica-se que de forma geral, os vinagres de damasco e malagueta possuem uma atividade antimicrobiana inferior aos antibióticos testados (controlos positivos). No entanto, para a espécie *C. neoformans*, o vinagre de malagueta ($13,17 \pm 1,88$ mm) apresentou uma atividade antimicrobiana superior à anfotericina B (12,50 mm). Além disso, *D. hansenii*, também apresentou uma maior sensibilidade aos vinagres de damasco ($12,61 \pm 1,14$ mm) e malagueta ($11,39 \pm 1,08$ mm), comparativamente aos antimicóticos nistatina (9,50 mm) e anfotericins B (sem formação de halo).

No estudo de Jabir *et al.* (2011) foram recolhidas 18 amostras de utentes com otomicose e avaliado o efeito antifúngico do vinagre de sidra através do método de difusão em agar contra os fungos patogénicos encontrados (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* e *Non-Candida albicans*). De acordo com os resultados, os autores constataram que o vinagre inibiu o crescimento de *C. albicans*, proporcionando o desenvolvimento de halos de inibição, com diâmetros de 17,5 mm. Estes valores são

concordantes com os resultados obtidos no presente estudo para *C. albicans* (ATCC 90028), que também apresentou halos de inibição, mas muito inferiores, para o vinagre de damasco e malagueta de $8,56\pm 0,68$ mm e $8,11\pm 0,70$ mm, respetivamente. Além disso, também foi testada a eficácia do antimicótico fluconazol contra os microrganismos patogénicos, o qual não inibiu o crescimento de *C. albicans*, o que está de acordo com os resultados obtidos para a estirpe *C. albicans* (ATCC 10231) do presente estudo.

Quanto ao estudo de Ousaid *et al.* (2021), foram avaliadas as propriedades antifúngicas de amostras de vinagre produzidas a partir de diferentes variedades de maçã (“red delicious”, “golden delicious”, “gala royal” e “diferentes variedades”) contra *C. albicans* e *Candida tropicalis*. De acordo com os resultados, a amostra de vinagre de maçã “red delicious” foi a mais eficiente a inibir o crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis*, tendo induzido halos de inibição com diâmetros compreendidos entre 11 e 12 mm. Pelo contrário, as restantes amostras de vinagre mostraram-se ineficazes na inibição do crescimento destes dois microrganismos. Segundo o autor, a atividade antimicrobiana destes produtos pode estar diretamente relacionada com o conteúdo em compostos bioativos, como ácidos orgânicos, especialmente o ácido acético, e compostos fenólicos. Neste caso, o vinagre de maçã “red delicious” que apresentou maior atividade antifúngica contra as leveduras em estudo, foi também aquele que apresentou maiores valores de concentração de compostos fenólicos totais ($1,98\pm 0,05$ mg de ácido gálico/100 ml) e de acidez ($4,02\pm 0,04$ % de ácido acético).

No estudo de Hammouda *et al.* (2021) foi feita uma avaliação da atividade antifúngica de amostras de vinagre tradicional (uva, figo da Índia, figo e tâmara) contra seis fungos patogénicos, nomeadamente *Fusarium equiseti*, *Trichothecium roseum*, *Nothophoma quercina*, *Penicillium sumatraense*, *Paecilomyces variotii* e *Alternaria alternate*. Somente os vinagres de figo e figo da Índia foram eficazes na inibição do crescimento das espécies *F. equiseti* e *T. roseum*, com formação de halos de inibição a variar de $12\pm 0,00$ a $14\pm 2,1$ mm e $11\pm 0,71$ a $12\pm 0,5$ mm, respetivamente. O halo de maiores dimensões foi registado para *F. equiseti* ($14\pm 2,1$ mm) e induzido pelo vinagre de figo. Mais uma vez esta atividade antifúngica é explicada pelo autor como uma consequência do alto teor de compostos fenólicos totais presentes nos vinagres de figo e figo da Índia comparativamente aos vinagres de uva e tâmara. Em ambos os estudos de Ousaid *et al.* (2021) e Hammouda *et al.* (2021), os vinagres apresentaram uma atividade antifúngica inferior à atividade antibacteriana, tal como se verifica no presente estudo.

4 - Conclusão

O potencial antimicrobiano e antioxidante de vinagres obtidos a partir de frutos fermentados (damasco e malagueta) foi avaliado através da determinação de parâmetros de qualidade físico-químicos e microbiológicos.

No que diz respeito aos parâmetros físico-químicos, o vinagre de damasco é o que possui maior valor de pH, acidez total e °Brix. De acordo com as normas estabelecidas pela legislação portuguesa, os valores de acidez total obtidos para as amostras de vinagre estão em conformidade com os parâmetros legais exigidos. Quanto às propriedades bioativas, o vinagre de malagueta apresenta a maior concentração de compostos fenólicos totais e o vinagre de damasco a maior concentração de compostos flavonoides totais. Verifica-se que ambos os vinagres têm um poder antioxidante fraco, de acordo com os baixos valores de concentração de compostos fenólicos obtidos.

Em relação ao parâmetro cor, os valores mais altos para as coordenadas L* e b* foram registados no vinagre de malagueta, enquanto o valor mais elevado para a coordenada a* foi verificado no vinagre de damasco. Além disso, relativamente às coordenadas C* e h°, os valores foram significativamente variáveis entre as amostras de vinagre, indicando, portanto, que as propriedades da cor de ambos os vinagres são diferentes.

Já no que se refere aos parâmetros microbiológicos, quanto à avaliação da qualidade dos produtos, verifica-se que ambos os vinagres apresentam valores inferiores a 1 UFC/ml, ou seja, abaixo do limite de deteção, o que garante a sua qualidade microbiológica. Esta qualidade é assegurada pela aplicação de processos tecnológicos de acabamento, como a pasteurização, que diminuem a proliferação microbiológica.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos produtos em estudo demonstra que as bactérias Gram-positivas mais fortemente inibidas pelos vinagres de damasco e malagueta foram as espécies *Staphylococcus aureus* e *Listeria innocua*. As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foram as espécies Gram-negativas que apresentaram maior sensibilidade a ambos os vinagres. As bactérias *Bacillus cereus*, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus epidermidis* foram as mais tolerantes ao vinagre de damasco, pois os halos de inibição do crescimento formados foram os mais pequenos. Para o vinagre de malagueta constatou-se que as bactérias *Salmonella* Typhimurium, *Cronobacter sakazakii* e *Staphylococcus epidermidis* foram as menos tolerantes. No caso dos antibióticos testados, o maior halo de inibição de crescimento

registou-se para a espécie *Staphylococcus epidermidis* sob efeito do cloranfenicol. Por outro lado, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi a bactéria para a qual se observaram os maiores halos de inibição de crescimento do estudo contra os vinagres, concluindo-se que esta sensibilidade superou a ação antimicrobiana dos antibióticos testados.

A avaliação da atividade antifúngica dos vinagres demonstrou que as leveduras que manifestaram maior sensibilidade aos produtos testados foram a espécie *Debaryomyces hansenii*, no caso do vinagre de damasco, e a espécie *Cryptococcus neoformans* quanto ao vinagre de malagueta. Contudo, o crescimento das leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens* e *Zygosaccharomyces bailli* não foi inibido pelos vinagres.

De forma geral, os vinagres causaram inibições do crescimento das leveduras inferiores comparativamente aos antimicóticos testados e apresentaram uma atividade antifúngica inferior à atividade antibacteriana.

5 - Perspetiva de Trabalhos Futuros

Como perspetiva de trabalhos futuros seria importante dar continuidade a estudos que permitam caracterizar de forma mais aprofundada os diferentes vinagres produzidos no Algarve, através:

- Quantificação e caracterização de compostos fenólicos, compostos voláteis e ácidos orgânicos presentes nos vinagres;
- Estudo da influência das tecnologias de produção nas características físico-químicas e microbiológicas dos diversos vinagres;
- Caracterização de novas matérias-primas, com vista à sua utilização na produção de vinagres e respetiva aceitabilidade por parte do consumidor.

6 - Referências Bibliográficas

- Associação Portuguesa dos Nutricionistas-APN (2017). Vinagres, temperar, o saber. *Coleção E-books APS*, nº44.
- Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U. A. (2001) Biotecnologia Industrial (Vol. IV). São Paulo: *Blucher*, pp.183–208.
- Aykin, E., Budak, N. H., e Guzel-Seydim, Z. B. (2015). Bioactive components of mother vinegar. *Journal of the American College of Nutrition*, 34, 80–89. <https://doi.org/10.1080/07315724.2014.896230>
- 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>
- Bekatorou, A. (2020). Advances in Vinegar Production. Contemporary Food Engineering Series, Da-Wen Sun, Series Editor. Boca Raton: *CRC Press, Taylor & Francis Group*.
- Bourgeois, J. F., e Barja, F. (2009). The history of vinegar and of its acetification systems. *Archives Des Sciences*, 62, 147–160.
- Budak, N. H., Aykin, E., e Seydim, A. C., Greene, A. K., Guzel-Seydim, Z. B. (2014). Functional Properties of Vinegar. *Journal of Food Science*, 79 (5). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12434>
- Carneiro, L., Sa, I.D., Gomes, F.D., Matta, V.M. e Cabral, L.M.C. (2002). Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. *Desalination* ,148(1–3), 93–98. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00659-8](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00659-8)
- Carvalho, W., Canilha, L., Silva, S.S. (2006). Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*, 23, 60-70. https://www.researchgate.net/publication/334330145_Uso_de_biocatalisadores_imobilizados_Uma_alternativa_para_a_conducao_de_bioprocessos
- Centro de Frutologia Compal. (2020). Origem, História e Composição Nutricional. Consultado a 20 de abril de 2022. Disponível em: <https://centrofrutologiacompal.pt/alperce/>
- Chinnici, F., Durán-Guerrero, E.; e Riponi, C. (2015). Discrimination of some European vinegars with protected denomination of origin as a function of their amino acid and biogenic amine content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 3762–3771. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7566>

Chou, C. H., Liu, C. W., Yang, D. J., Wu, Y. H., e Chen, Y. C. (2015). Amino acid, mineral, and polyphenolic profiles of black vinegar, and its lipid lowering and antioxidant effects in vivo. *Food Chemistry*, 168, 63–69.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.035>

Cocchi, M., Durante, C., Grandi, M., Lambertini, P., Manzini, D., e Marchetti, A. (2006). Simultaneous determination of sugars and organic acids in aged vinegars and chemometric data analysis. *Talanta*, 69, 1166–1175.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.12.032>

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>

Compo. (sem data). Características das malaguetas. Consultado a 18 de abril de 2022. Disponível em:

<https://www.compo.pt/guia/plantas/ervas-aromaticas-frutas-legumes/malaguetas>

Corazza, M. L., Rodrigues, D. G., e Nozaki, J. (2001). Preparação e Caracterização do Vinho de Laranja. *Química Nova*, 24, 449-452. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000400004>

Costa, V. S. C. (2014). Análise do processo de fabrico de vinagres. (Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar- Processamento de Alimentos). Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. *Repositório da Universidade de Lisboa*. <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/8574>

DL- Decreto-Lei nº 174/2007. Diário da República n.º 88/2007, Série I de 2007-05-08, páginas 2995 – 2997

EMR (2022). Global Vinegar Market to Grow at a CAGR of 1.6% between 2021-2026. Consultado a 27 de março de 2022. Disponível em: <https://www.expertmarketresearch.com/pressrelease/global-vinegar-market>

Eucast (2022). EUCAST disk diffusion method for Antimicrobial susceptibility testing. Versão 10.

Ganji, S. H., Kamanna, V. S., e Kashyap, M. L. (2003). Niacin and cholesterol: Role in cardiovascular disease (review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 298–305. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00284-X](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00284-X)

Gonçalves, R. (2017). Vinagre e Azeite- Portugueses gastam 11,4 milhões de euros em vinagres. *Hipersuper*, 351, 22-23. Consultado a 15 de junho de 2022. Disponível em: <https://www.hipersuper.pt/2017/12/05/hipersuper-anos-oferece-os-leitores-edicao-digital/>

Gomes, R. J., Borges, M. F., Rosa, M. 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), 139-151. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>

Hailu, S., Admassu, S., e Jha, Y. K. (2012). Vinegar Production Technology- An Overview. *Beverage & Food World*, 29-32.

https://www.researchgate.net/publication/280722745_Vinegar_Production_Technology_-_An_Overview

Hammouda, M. B., Mahfoudhi, A., Gharsallah, H., Hatmi, H. E., Attia, H., e Azabou, S. (2021). Traditional homemade Tunisian vinegars: Phytochemical profile, biological, physicochemical and microbiological properties. *Food Science and Technology*, 152 (2021), 112293. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112293>

He, H., Wang, L., Qiao, Y., Zhou, Q., Yang, B., Yin, L., Yin, D., e He, M. (2021). Vinegar/Tetramethylpyrazine Induces Nutritional Preconditioning Protecting the Myocardium Mediated by VDAC1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6670088>

Heikefelt, C (2011). Chemical and sensory analyses of juice, cider and vinegar produced from different apple cultivars. (Tese de mestrado em Horticultura). Swedish University of Agricultural Sciences. *SLU University Library*. <https://stud.epsilon.slu.se/2481/>

Henriques, A. F. F. (2014). Análise de um Processo Fermentativo para Desenvolvimento de um Produto Alimentar. (Tese de Mestrado em Tecnologia Química). Escola Superior de Tecnologia, Instituto Politécnico de Tomar. *Repositório Comum*. <https://www.rcaap.pt/results.jsp>

HiMedia. (2015). Plate Count Agar, M091S- Technical Data. *HiMedia Laboratories*, Mumbai, India.

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>

HunterLAB. (1996). CIE L*a*b* Color Scale. *Applications Note*, 8(7), 1–4.

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. (2019). Microbiology and technology of fermented foods (2ª Edição.). *IFT Press*, Wiley Blackwell.

INSA (2022). Tabela de Composição de Alimentos- Vinagre. Consultado a 3 de Abril de 2022. Disponível em: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/pdf?22324>

Instituto Nacional de Estatística (2013). *Estatísticas Agrícolas 2012*. Lisboa, p. 97.

Instituto Nacional de Estatística (2014). *Estatísticas Agrícolas 2013*. Lisboa, p. 96.

Instituto Nacional de Estatística (2015). *Estatísticas Agrícolas 2014*. Lisboa, p. 101.

Instituto Nacional de Estatística (2016). *Estatísticas Agrícolas 2015*. Lisboa, p. 97.

- Instituto Nacional de Estatística (2017). *Estatísticas Agrícolas 2016*. Lisboa, p. 97.
- Instituto Nacional de Estatística (2018). *Estatísticas Agrícolas 2019*. Lisboa, p. 92.
- Instituto Nacional de Estatística (2020). *Estatísticas Agrícolas 2021*. Lisboa, p. 107.
- ISO. (1998). ISO 15214: Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 °C. *International Standard*, 1ª Edição.
- ISO. (2008). ISO 21527: Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. *International Standard*, 1ª Edição.
- ISO. (2013). ISO 4833-1: Microbiology of the food chain- Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique. *International Standard*, 1ª Edição.
- Jabir, H.B, Abbas, F. N.; Khalaf, R. M. (2011). In vitro assessment of antifungal potencial of apple cider vinegar and acetic versus fluconazole in clinical isolates of otomycosis. *Thi-Qar Medical Jornal*, 1, 126-133. <https://www.iasj.net/iasj/article/47709>
- Karaagac R. A., Aydogan M. N., Koseoglu M. S. (2016). An investigation on antimicrobial and antioxidant activities of naturally produced mulberry vinegar. *Journal of Pharmaceutical Biology*, 6, 34-39. <https://doi.org/10.18036/estubtdc.681028>
- Kim, D. H., Chon, J. W., Kim, H., 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, 106717. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106717>
- Kocher, G.S., e Dhillon, H.K. (2013). Fermentative production of sugarcane vinegar by immobilized cells of *Acetobacter aceti* under packed bed conditions. *Sugar Tech*, 15 (1),71–76. <https://doi.org/10.1007/s12355-012-0179-4>
- Konica Minolta (2022). Compreendendo o Espaço de Cor CIE L*C*h. Consultado a 10 de julho de 2022. Disponível em: <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/compreendendo-o-espaco-de-cor-cie-lch/>
- Koyama, M., Ogasawara, Y., Endou, K., Akano, H., Nakajima, T., Aoyama, T., e Nakamura, K. (2017). Fermentation-induced changes in the concentrations of organic acids, amino acids, sugars, and minerals and superoxide dismutase-like activity in tomato vinegar. *International Journal of Food Properties*, 20, 888–898. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1188309>
- Leonel, M., Suman, P.A., e Garcia, E.L. (2015). Production of ginger vinegar. *Ciência e Agrotecnologia*, 39 (2),183–190. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000200010>
- Lianda, R L. P.; Castro, R. N. (2008). Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellífera*. *Quim Nova*, 31 (6), 1472-1475. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000600036>

Lozano, J.E. (2006). Processing of fruits: ambient and low temperature processing. In *Fruit Manufacturing: Scientific Basis, Engineering Properties, and Deteriorative Reactions of Technological Importance*. Nova Iorque: *Springer*, pp. 21–51.

Luís, V. P. M. D. (2017). Otimização de processos fermentativos a partir de citrinos. (Tese de Mestrado em Tecnologia Química). Escola Superior de Tecnologia, Instituto Politécnico de Tomar. *Repositório Comum*.
<https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/21363>

Maestre, K. L. (2017). Estudo de condições de fermentação alcoólica e acética utilizando subproduto lácteo e diferentes leveduras. (Tese de Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná- Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Toledo, Brasil. *BDTD Biblioteca Digital de Teses e Dissertações*.
<https://tede.unioeste.br/>

Mamlouk, D., e Gullo, M. (2013). Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377–384.
<https://doi.org/10.1007/s12088-013-0414-z>

Marques, F. P. P., Spinosa, W., Fernandes, K. F., Castro, C. F. S., e Caliari, M. (2010). Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 119–126.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500019>

Matsushita, K., Toyama, H., Tonouchi, N., e Okamoto-Kainuma, A. (2016). Physiology of *Acetobacter* and *Komagataeibacter* spp. during acetic acid fermentation. In *Acetic Acid Bacteria- Ecology and Physiology*. Japão, *Springer*, pp. 223-232.

Norma Portuguesa NP – 785 Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação do resíduo seco solúvel. Processo corrente. Official Methods of Analysis - A.O.A.C., 15th Edition, Kenneth, USA, 1990.

Ochoa, R. F.; Castro, J. A.O.; Mendoza, C. V. V.; Minakata, P. E.; Junquera, V. I. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Acta Química Mexicana, Revista Científica Autónoma de Coahuila*, 6(3),42-56.
https://www.researchgate.net/publication/220007839_Inmovilizacion_de_celulas_y_enzimas

OENO 52-2000. (2000). Wine Vinegars - Determination of Total Acidity Content. *Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV)*.

Othaman, M.A., Sharifudin, S.A., Mansor, A., Kahar, A.A., e Long, K. (2014). Coconut water vinegar: new alternative with improved processing technique. *Journal of Engineering Science and Technology*, 9(3), 293–302.

Ousaaid, D., Mechchate, H., Laaroussi, H., Hano, C., Bakour, M., Ghouizi, A. E., Conte, R., Lyoussi, B., e Arabi, I. E. (2021). Fruits Vinegar: Quality Characteristics, Phytochemistry, and Functionality. *Molecules*, 27, 222.
<https://doi.org/10.3390/molecules27010222>

Ousaaïd, D., Laaroussi, H., Mechchate, H., Bakour, M., Ghouizi, A., E., Mothana, R. A., Noman, O., Es-safi, I., Lyoussi, B., e Arabi, I., E. (2022). The nutritional and antioxidant potencial of artesanal and industrial apple vinegars and their ability to inhibit key enzymes related to type 2 diabetes in vitro. *Molecules*, 27, 567. <https://doi.org/10.3390/molecules27020567>

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. <http://dx.doi.org/10.15361/1984-5529.2015v43n4p302-308>

Perestrelo, R., Silva, C. L., Silva, P., e Câmara, J. S. (2018). Establishment of the volatile signature of wine-based aromatic vinegars subjected to maceration. *Molecules*, 23 (2),499. <https://doi.org/10.3390/molecules23020499>

Persistence Market Research (2017). Global Market Study on Dressing Vinegar and Condiments: Apple Cider Vinegar and Red Wine Vinegar Segments Projected to Gain High BPS Shares during 2016–2024. Consultado a 27 de março de 2022. Disponível em: <https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/dressing-vinegar-and-condiments-market.asp>

Pinu, F. R., Carvalho-Silva, S., Uetanabaro, A. P. T., e Villas-Boas, S. G. (2016). Vinegar Metabolomics: An explorative study of comercial balsamic vinegars using gas chromatography- Mass spectrometry. *Journal Metabolites*, 6, 22. <https://doi.org/10.3390/metabo6030022>

Portugal Fresh- Frutas Legumes Flores. (2018). Malagueta. Consultado a 18 de abril de 2022. Disponível em: <https://portugalfresh.org/produto/malagueta/>

Quintana, L. M., Castro, R., e Guerrero, E. (2021). Biotechnological Processes in Fruit Vinegar Production. *Foods*, 10,945. <https://doi.org/10.3390/foods10050945>

Radiant Insights, Inc (2018). Global Vinegar Market 2017-2021. Consultado a 27 de março de 2022. Disponível em: <https://www.yumpu.com/en/document/read/59161990/global-vinegar-market-2017-2021-radiant-insights>

Rajauria, G., e Tiwari, B. (2017). Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis. London, UK: *Academic Press*, pp. 131–152.

Raspor, P., e Goranovič, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101–124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>

Regulamento (CEE) N° 2676/90, 17 setembro, 1990. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 272, 1-192.

Rigolon, T.C.B.; Barros, F.A.R.; Stringheta, P. C. (2022). Predição de compostos bioativos utilizando parâmetros colorimétricos para morango, framboesa e juçara. *7º Simpósio de Segurança Alimentar, Inovação com Sustentabilidade*.

Rodrigo, R., Prat, H., Passalacqua, W., Araya, J., e Bächler, J. P. (2008). Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension. *Clinical Science*, 114, 625–634. <https://doi.org/10.1042/CS20070343>

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 CO₂ stripping for bioethanol production. *Chemical Engineering Research and Design*, 132, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.12.024>

Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I., e Frebortova, J. (2015). Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 33, 1260-1271. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.001>

Sáiz-Abajo, M.-J., Gonzales-Sáiz, J.-M., e Pizarro, C. (2004). Classification of wine and alcohol vinegar samples based on near-infrared spectroscopy. Feasibility study on the detection of adulterated vinegar samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7711-7719. <https://doi.org/10.1021/jf049098h>

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>

Scharlau (2022a). MRS agar, Reference 064-BA0582. *Scharlau Microbiology-Technical Data*.

Scharlau (2022b). Malt Extract agar, Reference 064-PA0027. *Scharlau Microbiology- Technical Data*.

SEMAGRO (Secretaria de Estado de Meio Ambiente, Desenvolvimento Econômico, Produção e Agricultura Familiar). (2015). Benefícios do Damasco. Consultado a 20 de abril de 2022. Disponível em: <https://www.semagro.ms.gov.br/beneficios-do-damasco-saiba-tudo/>

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.; Ozturk, B. (2020). Screening physicochemical, microbiological and bioactive properties of fruit vinegars produced from various raw materials. *Food Sci Biotechnol*, 29 (3), 401-408. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00678-6>

Silveira, A. C., Kassuia, Y. S., Domahovski, R.C., Lazzarotto, M. (2018). Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível- Comunicado técnico 421. *Embrapa*.

Shah, N. N., e Singhal, R. S. (2017). Fermented Fruits and Vegetables. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. *Food and Beverages Industry*. (Capítulo 3, pp 45-89). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00003-0>

Solieri, L., e Giudici, P. (2009). Organisms Associated with Acetic Acid Bacteria in Vinegar Production. In L. Solieri & P. Giudici, *Vinegars of the World*. Verlag- Itália: Springer, pp. 73-95.

Souza, P.M., e Magalhães, P. O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (4), 850–861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>

Suman, P. A. (2012). Processo de obtenção de vinagre de gengibre. (Tese de Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agronômicas. *Repositório Institucional UNESP*. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/90532>

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., Mas, A. (2010). Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology*, 27, 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.10.001>

Veberic, R., Trobec, M., Herbingler, K., Hofer, M., Grill, D., e Stampar, F. (2010). Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1687–1694. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2113>

Veloso, C. L. (2013). Dossiê Técnico: Sistema de Produção de Vinagre. *Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas*.

Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., e Conte, A. (2007). Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry*, 105, 564–571. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.014>

Wang, H. Y., Qian, H., e Yao, W. R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128, 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.075>

Watts, E.G, Janes, M. E., Prinyawiwaktul, W., Shen, Y., Xu, Z.; e Johnson, D. (2018). Microbiological changes and their impact in quality characteristics of red hot chilli pepper mash during natural fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 53, 1816–1823. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13792>

Xia, T., Yao, J. H., Zhang, J., Zheng, Y., Song, J., e Wang, M. (2017). Protective effects of Shanxi aged vinegar against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in LO2 cells through Nrf2-mediated antioxidant responses. *RSC Advances*, 7, 17377–17386. <https://doi.org/10.1039/C6RA27789F>

Xia, T., Zhang, B., Duan, W., Zhang, J., e Wang, M. (2020). Nutrients and bioactive componentes from vinegar: A fermented and functional food. *Journal of Functional Foods*, 64. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103681>

x-rite Pantone. (2016). A Guide to Understanding Color. X-rite Pantone, Inc, L10-001 (03/16), 1-40.

Yang, L., Wang, X., e Yang, X. (2014). Possible antioxidant mechanism of melanoidins extract from Shanxi aged vinegar in mitophagy-dependent and mitophagy-independent pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8616–8622. <https://doi.org/10.1021/jf501690e>

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)