



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**LUCYNEI TENÓRIO DE ARAÚJO**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E DO ENVELHECIMENTO DO VINAGRE DE**  
**LARANJA LIMA**

**Maceió**  
**2012**

**LUCYNEI TENÓRIO DE ARAÚJO**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E DO ENVELHECIMENTO DO VINAGRE DE  
LARANJA LIMA**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Universidade Federal de Alagoas, como requisito  
para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia  
Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Karla de Souza Abud

**Maceió  
2012**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária: Fabiana Camargo dos Santos**

A663e Araújo, Lucynei Tenório de.  
Estudo da produção e do envelhecimento do vinagre de laranja lima / Lucynei Tenório de Araújo. -- 2012.  
121 f. : il., tabs., graf.

Orientadora: Ana Karla de Souza Abud.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2012.

Bibliografia: f. 109-121.

1. Vinagre – Produção. 2. Laranja lima. 3. Vinagre - Envelhecimento. 4. Vinagre – Análise sensorial. I. Título.

CDU: 663.15:634.31

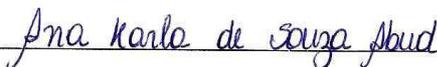
Lucynei Tenório de Araújo

ESTUDO DA PRODUÇÃO E DO ENVELHECIMENTO DO VINAGRE DE  
LARANJA LIMA

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Alagoas, como requisito para a  
obtenção do Título de Mestre em Engenharia  
Química

Aprovada em: Maceió, 16 de Março de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Ana Karla de Souza Abud  
(PPGEQ/UFAL – Orientadora)



Prof. Dr. João Nunes de Vasconcelos  
(PPGEQ/UFAL)



Prof. Dr. Antônio Martins de Oliveira Junior  
(UFS - Membro Externo)



*Às pessoas que mais torcem por mim, meus pais, Amaro Correia e Edilene Tenório.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por mais uma vez me fazer ir além do que os meus olhos poderiam imaginar;

À minha orientadora Ana Karla de Souza Abud, por tamanha competência e dedicação ao ensino e a pesquisa. São poucos os profissionais que vestem a camisa por amor ao seu trabalho;

Ao querido professor Evandir Gonçalves de Oliveira (in memoriam), por seus ensinamentos tão preciosos deixados aos futuros pesquisadores, por sua humildade, dedicação e amor ao longo da vida, onde sempre com sutileza transmitia sabedoria a todos.

Aos professores Antonio Martins de Oliveira Júnior e João Nunes de Vasconcelos, por terem aceitado o convite de fazerem parte da banca julgadora e avaliarem com tanto cuidado o meu trabalho;

Ao professor Wagner Roberto de Oliveira Pimentel, por sempre poder contar com sua amizade;

Aos meus pais, minha irmã, Lucyana e meu cunhado Cadu, pela paciência em meus momentos de estudo;

Ao Sr. Edgar e ao meu pai Amaro, pela construção das vinagreiras e fornecimento de madeiras a serem utilizados no estudo;

À FAPEAL, CAPES, MARATÁ, SEBRAE e COOPLAL, pelo apoio e incentivo ao longo trabalho;

Aos meus companheiros de laboratório: Brígida, Jânio, Leonardo, Lívia e Natan, por fazerem tão gostoso e divertido cada minuto no Laboratório de Ensino a Engenharia Química (LEEQ). Em especial, a Carlos Eduardo, por muitas vezes me acompanhar até tarde, até nos finais de semana e por seus conselhos;

A minhas amigas, Magarete e Renara, por me ouvirem, sorrirem e chorarem comigo. Foram tão especiais que tenho certeza que conhecem de longe o meu humor.

Eram vocês que ouviam com toda a alegria do mundo minhas aventuras, que se importavam em meio as minhas enfermidades e quem me aconselhavam. Nunca vou esquecer as horas de shopping, cinema, balada, tatuagem e a minha primeira festa surpresa com essa amiga que veio tão longe, do Piauí, Renara.

Aos meus amigos de curso: Bruno, Cássia, Jailson, Jeilma, Lúcio e Prazeres. Pelas divertidas horas na salinha de estudo.

## RESUMO

A industrialização de alimentos pode contribuir de maneira marcante ao permitir o aproveitamento de excedentes de safra, reduzindo desperdícios, contribuindo com o incentivo e diversificação da produção agrícola, bem como agregando valor à produção. Concentrada no Vale do Rio Mundaú, a cultura da laranja lima tem no município de Santana do Mundaú a sua principal referência e centro de produção do Nordeste. Apesar das vantagens e facilidades, os investimentos na citricultura no Estado ainda são limitados, resultando em baixos índices de produtividade e descarte do produto excedente da região. Este trabalho teve como objetivo desenvolver tecnologias de aproveitamento integral do excedente da produção de laranja lima da região do Vale do Mundaú, localizado em Maceió/AL, produzindo vinagres de laranja lima, sob diferentes formulações de envelhecimento e avaliando a sua aceitação. O processo fermentativo foi realizado em duas etapas, sendo, primeiro, realizada a fermentação etanólica e, em seguida, a fermentação acética, todas acompanhadas de análises físico-químicas e sensoriais. Os substratos etanólicos de laranja lima obtidos apresentaram-se de acordo com a legislação e com boa aceitação entre os consumidores. Foram realizados vários estudos para produção do vinagre, sendo o processo Orleans com algumas adaptações o que resultou na produção de um vinagre de boa qualidade. O primeiro vinagre de laranja lima foi obtido após um mês e vinte e seis dias, apresentando 4,41% de acidez em ácido acético, 0,1 °GL de teor etanólico residual e pH de 2,70. Os demais vinagres foram obtidos em menos tempo. A simulação do envelhecimento dos vinagres foi realizada por diferentes tratamentos, utilizando pedaços de madeira de eucalipto, pino, pinho, canela e pedaços de rolhas de cortiça, sob condições físicas de presença e ausência de luz, em garrafas plásticas, tipo PET, visando detectar um produto com sabor e aroma suave. Os vinagres se encontraram dentro do exigido pela legislação brasileira para análise de etanol, acidez, cinzas e pH, à exceção da análise de extrato seco nos vinagres sob simulação de envelhecimento em 1 mês e em rolhas de cortiça. Os vinagres simulados em envelhecimento na ausência de luz apresentaram colorações um pouco maior em relação aos envelhecidos na presença de luz. Os vinagres submetidos à análise sensorial de cor e aroma indicaram coloração mais clara e menor concentração em ácido acético, sendo mais aceito. A análise sensorial de aroma indicou que o tempo de envelhecimento não deve ser superior a 42 dias e que o pino gerou produto de maior aceitação. Tais resultados permitem agregar valor à cultura da laranja lima na região, cumprindo uma função ambiental ao se evitar perdas e/ou descarte inadequado do produto. A obtenção artesanal de vinagre é uma das alternativas tecnológicas de aproveitamento dos frutos, o qual pode ser utilizado na área rural ou até mesmo comercializado, agregando valor à cultura com a diversificação de um novo produto.

**Palavras-chave:** Vinagre. Laranja lima. Envelhecimento. Análise sensorial.

## ABSTRACT

Food industrialization may contribute positively when it allows the use of exceeding of crops, reducing wasting, contributing with incentive and diversification of agriculture production as well as adding value to production. Centered at the Mundau River Valey, the lime orange growth has in the Santana of Mundau County its major reference and main production in Northeastern Brazil. Despite the advantages and facilities, investments in the citrus agriculture in the State are still limited, resulting in low productivity and dispose of the exceeding products of the region. This work had the intention of developing technologies for full use of the exceeding production of lime orange of the State of Alagoas, evaluating the commercial viability and acceptance of the lime orange vinegar under different conditions of aging. The fermentative process was performed in two steps, the first one was the ethanolic fermentation and then the acetic fermentation, both being carried with chemical-physical and sensorial analysis. The lime orange's ethanolic substrate obtained was according to the legislation and was well accepted by the consumers. Many studies were performed for the making of the vinegar, being the Orleans process – with a few modifications – the one with the best results. The first lime orange vinegar was obtained after a month and twenty six days, showing 4.41% acidity in acetic acid, 0.1 °GL residual alcohol by volume and pH 2.70. The other ones took less time to be made. The aging of vinegar was made with different treatments using pieces of wood of eucalyptus, pino, pine, cinnamon, pieces of cork, under physical conditions of presence and absence of light, with plastic bottles (PET type), aiming for a product with suave flavor and smell. The vinegar types were all in accordance with the demands of the Brazilian legislation for ethanol, acidity, ashes and pH analysis except the dry extract analysis of the vinegar under the one month long cork aging simulation. The vinegar under the light absent aging simulation showed color more intensively then the ones in the presence of light. The ones tested by the sensorial analysis of color and smell indicated lighter color and less acetic acid concentration, being more accepted. The sensorial analysis showed that the aging period should not exceed 42 days and that the pine generated a more accepted product. Such results allow value attachment to the lime orange culture at the region, fulfilling an environmental function avoiding loss and/or inappropriate discard of the product. The artisan way of obtaining vinegar is one of the technological alternatives for the use of the fruits, which can be utilized in rural areas or even, commercialized, attaching value to the culture with the diversification of a new product.

**Keywords:** Vinegar. Orange file. Aging. Sensory analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Laranjas doces .....	18
<b>Figura 2</b> – Modelo de vinagreira do processo lento .....	35
<b>Figura 3</b> – Modelo de vinagreira do processo rápido .....	37
<b>Figura 4</b> – Desenho de um acetificador Frings .....	38
<b>Figura 5</b> – Visualização de um acetificador Frings .....	39
<b>Figura 6</b> – Laranjas limas imersas em solução de hipoclorito de sódio .....	49
<b>Figura 7</b> – Fluxograma do processo de fermentação etanólica .....	58
<b>Figura 8</b> – Processo de filtração do vinho .....	60
<b>Figura 9</b> – Detalhamento da vinagreira I .....	61
<b>Figura 10</b> – Detalhamento da vinagreira II .....	62
<b>Figura 11</b> – Vinagreiras I e II em processo de fermentação .....	63
<b>Figura 12</b> – Ebuliômetro utilizado para a determinação do teor etanólico .....	66
<b>Figura 13</b> – Microscopia das leveduras comercial (a) e RL 11 (b) .....	71
<b>Figura 14</b> – Visualização microscópica das bactérias acéticas do vinagre de laranja lima .....	72
<b>Figura 15</b> – Processo de fermentação etanólica (a) e vinho da laranja lima (b) .....	76
<b>Figura 16</b> – Acompanhamento cinético do Brix e concentração de etanol em função do tempo no processo de fermentação etanólica .....	78
<b>Figura 17</b> - Acompanhamento do pH e da acidez em função do tempo no processo de fermentação etanólica .....	80
<b>Figura 18</b> – Visualização do sistema inicial de fermentação acética .....	83
<b>Figura 19</b> - Formação da mãe do vinagre após 3 semanas de processo .....	84
<b>Figura 20</b> – Formação da mãe do vinagre após 6 semanas de processo (a) e substância polímera-gelatinosa (b) .....	84

<b>Figura 21</b> – Comportamento cinético da primeiro vinagre produzido na fermentação acética da vinagreira I .....	85
<b>Figura 22</b> – Comportamento cinético do segundo e terceiro vinagre produzido no primeiro estudo de fermentação acética na vinagreira I .....	87
<b>Figura 23</b> – Acompanhamento da acidez e do pH ao longo da fermentação acética .....	88
<b>Figura 24</b> – Comportamento cinético do segundo estudo de fermentação acética na vinagreira I .....	89
<b>Figura 25</b> – Comportamento cinético do segundo vinagre produzido no segundo estudo de fermentação acética na vinagreira I .....	90
<b>Figura 26</b> – Comportamento cinético do primeiro estudo de fermentação acética na vinagreira II .....	91
<b>Figura 27</b> – Vinagre sendo produzido na vinagreira II .....	92
<b>Figura 28</b> – Filtração (a) e visualização de sujidades no vinagre (b) .....	93
<b>Figura 29</b> – Processo de pasteurização do vinagre .....	93
<b>Figura 30</b> – Simulação do envelhecimento dos vinagres .....	94
<b>Figura 31</b> – Leitura das absorvâncias dos vinagres no primeiro estudo de produção de vinagre .....	95
<b>Figura 32</b> – Visualização das amostras de vinagres .....	99
<b>Figura 33</b> – Índice de aceitação da cor do vinagre .....	100
<b>Figura 34</b> – Índice de concordância da cor do vinagre .....	101
<b>Figura 35</b> – Média das notas da cor do vinagre entre 0 á 42 dias .....	102
<b>Figura 36</b> – Média das notas da cor do vinagre entre 42 á 112 dias .....	102
<b>Figura 37</b> – Índice de aceitação do aroma do vinagre .....	103
<b>Figura 38</b> – Coeficiente de concordância da avaliação do aroma dos vinagres .....	103
<b>Figura 39</b> – Média das notas atribuídas ao aroma do vinagre .....	104
<b>Figura 40</b> – Média da análise sensorial de sabor e teste de atitude .....	106
<b>Figura 41</b> – Índice de aceitação da análise sensorial de sabor .....	106

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Teor de ácido ascórbico dos diferentes sucos cítricos .....	19
<b>Quadro 2</b> – Capacidade antioxidante das diferentes variedades de laranja .....	20
<b>Quadro 3</b> - Importações brasileiras de vinhos e espumantes, 2007 a 2011 .....	21
<b>Quadro 4</b> - Consumo de vinhos finos no Brasil, 2007 a 2011 .....	22
<b>Quadro 5</b> - Classificação dos vinagres brasileiros .....	29
<b>Quadro 6</b> - Pontuação da escala hedônica .....	105
<b>Quadro 7</b> - Pontuação da escala hedônica em relação a atitude do consumidor ...	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Caracterização das laranjas lima .....	72
<b>Tabela 2</b> – Características físico-químicas da polpa de laranja lima .....	73
<b>Tabela 3</b> – Resumo do estudo de fermentação etanóica .....	74
<b>Tabela 4</b> – Características do substrato etanóico de laranja lima usado para a produção de vinagre .....	75
<b>Tabela 5</b> – Características físico-químicas dos substratos de laranja lima obtidos a partir da forma de condução laboratorial .....	79
<b>Tabela 6</b> – Avaliação sensorial dos substratos I e II .....	82
<b>Tabela 7</b> – Condições para envelhecimento dos vinagres no primeiro estudo de produção .....	94
<b>Tabela 8</b> – Condições para envelhecimento dos vinagres no segundo estudo de produção .....	95
<b>Tabela 9</b> – Análises finais dos vinagres após envelhecimento.....	97
<b>Tabela 10</b> – Parâmetros iniciais e finais dos vinagres .....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido ascórbico

APL – Arranjo Produtivo Local

AR – Açúcares redutores

ART – Açúcares redutores totais

ATP - Moléculas de adenosina trifosfato

CA – Vinagre envelhecido em rolhas de cortiça na ausência de luz

Ca - Cálcio

CB – Branco do vinagre envelhecido em rolhas de cortiça

CL – Vinagre envelhecido em rolhas de cortiça na presença de luz

EA – Vinagre envelhecido em madeira de eucalipto na ausência de luz

EL – Vinagre envelhecido em madeira de eucalipto na presença de luz

Fe - Ferro

GK - Concentração total

HA – Vinagre envelhecido em madeira de pinho na ausência de luz

HB – Branco do vinagre envelhecido em madeira de pinho

HL – Vinagre envelhecido em madeira de pinho na presença de luz

K - Potássio

LEEQ – Laboratório de Ensino em Engenharia Química

LTBA – Laboratório de Bebidas e Alimentos

NA – Vinagre envelhecido em madeira de canela na ausência de luz

Na - Sódio

NB – Branco do vinagre envelhecido em madeira de canela

NCM – Nomenclatura Comum do Mercosul

NL – Vinagre envelhecido em madeira de canela presença de luz

Mg - Magnésio

Mn - Manganês

PA – Vinagre envelhecido em madeira de pino na ausência de luz

PB – Branco do vinagre envelhecido em madeira de pino

PET – Politereftalato de etileno

pH – Potencial de hidrogênio iônico

PL – Vinagre envelhecido em madeira de pino na presença de luz

S – Enxofre

SST/ATT - Relação entre teor de sólidos solúveis e o teor de ácidos tituláveis

SEBRAE-AL – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Alagoas

Substrato I – Vinho de laranja lima produzido em julho de 2010

Substrato II – Vinho de laranja lima produzido em agosto de 2010

Substrato III – Vinho de laranja lima produzido na primeira quinzena de janeiro de 2011

Substrato IV – Vinho de laranja lima produzido na segunda quinzena de janeiro 2011

Substrato V – Vinho de laranja lima produzido em novembro de 2011

Substrato VI – Vinho de laranja lima produzido em outubro de 2011

Substrato VII – Vinho de laranja lima produzido em janeiro de 2012

UFAL – Universidade Federal de Alagoas

UFLA – Universidade Federal de Lavras

V – Volume

v – Vinagre comercial de maçã

Vinagreira I – Vinagreira imitando o processo Orleans

Vinagreira II – Vinagreira imitando o processo Alemão

YPDA - Yeast Peptone Dextrose Agar

$\lambda$  - Comprimento de onda

° Brix – Graus Brix

°C – Graus Celsius

°GL – Graus Gay Lussac

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Cultura cítrica da laranja</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Fermentação</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 Fermentação etanóica .....	21
2.2.2 Fermentação acética .....	24
<b>2.3 Vinagre</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4 Legislação e composição do vinagre</b> .....	<b>28</b>
2.4.1 Ácido acético .....	30
2.4.2 Álcool etílico (etanol) residual .....	31
2.4.3 Extrato seco .....	31
2.4.4 Cinzas .....	32
<b>2.5 Bactérias acéticas</b> .....	<b>32</b>
<b>2.6 Processos de fabricação</b> .....	<b>33</b>
2.6.1 Processo Orleans .....	34
2.6.2 Processo Alemão .....	36
2.6.3 Processo submerso .....	38
2.6.4 Processamento final do vinagre .....	40
<b>2.7 Contaminação do vinagre</b> .....	<b>41</b>
2.7.1 Contaminação microbiológica .....	41
2.7.2 Contaminação macrobiológica .....	42
2.7.3 Contaminação química .....	43
<b>2.8 Simulação do envelhecimento</b> .....	<b>43</b>
<b>2.9 Análise sensorial</b> .....	<b>45</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
<b>3.1 Geral</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2 Específicos</b> .....	<b>47</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1 Crescimento, isolamento e caracterização dos micro-organismos nas etapas de fermentação</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2 Obtenção e caracterização físico-química da polpa de laranja lima</b> .....	<b>49</b>

4.2.1 Determinação do pH .....	50
4.2.2 Determinação da acidez .....	50
4.2.3 Determinação de sólidos solúveis .....	51
4.2.4 Determinação de resíduo mineral fixo .....	51
4.2.5 Determinação de proteínas total .....	52
4.2.6 Determinação de lipídios .....	53
4.2.7 Açúcares redutores totais .....	54
4.2.8 Determinação da umidade .....	55
4.2.9 Determinação de vitamina C .....	56
4.2.10 Determinação do teor de carboidratos e valor energético .....	57
<b>4.3 Fermentação etanóica .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4 Fermentação acética .....</b>	<b>61</b>
4.4.1 Filtração e pasteurização .....	64
4.4.2 Técnicas de envelhecimento .....	64
<b>4.5 Caracterização do vinho e do vinagre .....</b>	<b>65</b>
4.5.1 Determinação do teor etanóico .....	66
4.5.2 Extrato seco reduzido .....	67
4.5.3 Determinação da acidez total .....	67
4.5.4 Determinação da acidez fixa .....	68
4.5.5 Determinação da acidez volátil .....	68
4.5.6 Determinação de coliformes .....	68
<b>4.6 Análise sensorial .....</b>	<b>69</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>5.1 Crescimento, isolamento e caracterização dos micro-organismos nas etapas de fermentação .....</b>	<b>71</b>
<b>5.2 Obtenção e caracterização físico-química da polpa de laranja lima .....</b>	<b>72</b>
<b>5.3 Fermentação etanóica .....</b>	<b>74</b>
<b>5.4 Fermentação acética .....</b>	<b>82</b>
5.4.1 Filtração e pasteurização .....	92
5.4.2 Envelhecimento .....	93
<b>5.5 Análise sensorial .....</b>	<b>99</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Estado de Alagoas, a citricultura se diferencia por ser voltada à agricultura familiar. A cultura da laranja lima tem no município de Santana do Mundaú-AL a sua principal referência e centro de produção do Nordeste, com cerca de 90% da produção regional. Com o objetivo de melhorar o sistema de produção, exclusivo de pequenos agricultores, transformando a citricultura da laranja lima numa referência nacional para a produção sustentável, foi lançado em setembro de 2008 o Arranjo Produtivo Local (APL) da Laranja no Vale do Mundaú. Tal projeto reforça a necessidade de o Estado iniciar e desenvolver processos de modernização da cultura, beneficiando os agricultores (INVEST NE, 2008).

O solo e clima favoráveis contribuem para a produção de frutos de qualidade, com laranjas limas grandes, doces, de menor acidez, polpa muito suculenta e de coloração amarelada, sendo reconhecidas por consumidores alagoanos e de outros Estados brasileiros. Contudo, pela falta de investimentos na cultura, há altos índices de desperdício, principalmente no processo de comercialização. Por se tratar de uma matéria-prima facilmente suscetível à degradação, são descartadas grandes quantidades de laranjas que não apresentam qualidade para o consumo *in natura*, pois possuem vários defeitos nas cascas, nos tamanhos, na coloração, na consistência, entre outros fatores.

A indústria de alimentos pode contribuir de maneira marcante para o incentivo e estabilização da produção agrícola, permitindo um melhor aproveitamento dos resíduos e frutos pós-colheita que apresentam defeitos, sem qualidade para o consumo *in natura*, trazendo contribuições para diversificar e melhorar a utilização desses alimentos durante todo o ano. Entre os produtos utilizados para o aproveitamento de excedentes da safra, especialmente as de propriedades rurais que, de outra forma, não poderiam competir no mercado, tem-se o vinagre, utilizado no mundo inteiro como condimento e conservante de alimentos.

A produção de vinagre se dá por dois processos bioquímicos distintos, ambos resultantes da ação de micro-organismos: a fermentação etanóica, pela ação de leveduras sobre matérias-primas açucaradas e a fermentação acética, pela ação de bactérias aeróbias do gênero *Acetobacter* (TAKAOMI et al., 1991; SOKOLLEK et al., 1998; LU et al., 1999; BORTOLINI et al., 2001).

A legislação brasileira define vinagre ou vinagre de vinho como o produto obtido da fermentação acética do vinho que deve conter uma acidez volátil mínima de 40g por litro, expresso em ácido acético (4%). Sua graduação etanólica não pode exceder a 1% em volume de etanol e deve ser, obrigatoriamente, pasteurizado (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1974).

A fabricação de vinagre proporciona um meio de utilização de matéria-prima inaproveitável da comercialização de frutas (EVANGELISTA, 1989) e, quando comparado a outros tipos de vinagre, os de frutas são tidos como superiores em qualidades sensoriais e nutritivas, possuindo sabor e aroma próprio (LU et al., 1999). Os vinagres produzidos pelo método lento são menos ácidos por sofrerem envelhecimento durante a sua preparação, comparando-se com os que são produzidos pelos métodos rápido e submerso, os quais só melhoram consideravelmente seu sabor e adquirem mais corpo quando submetidos ao envelhecimento em barris (AQUARONE et al., 1983).

Com base no que foi apresentado, este trabalho estudou a produção de vinagre de laranja lima, utilizando o processo lento com algumas adaptações, e avaliou as características físico-químicas e sensoriais do produto a partir da simulação do envelhecimento em diferentes pedaços de madeira, desenvolvendo-se uma alternativa tecnológica de aproveitamento para os produtores locais.

Essa dissertação de Mestrado aborda revisão sobre a cultura cítrica da laranja, os processos de fermentação etanólica e acética, a produção e o envelhecimento do vinagre e a avaliação sensorial. Também, são apresentados os objetivos do estudo e a metodologia empregada no trabalho, apresentando e discutindo os resultados experimentais das fermentações e das caracterizações físico-químicas e sensoriais. Por fim, são colocadas as conclusões e as referências bibliográficas buscadas para o trabalho.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cultura cítrica da laranja

De origem asiática, a laranjeira possui estrutura mediana, atingindo no máximo 8 metros, tronco com casca de coloração castanho-acizentada, folhas de textura firme, bordos arredondados e de forte aroma quando maceradas. As flores, de coloração branca, pequena e aromática, atraem abelhas (HENDRIX e REDD, 1995). O gênero *Citrus*, pertencente à família Rutaceae, de casca de cor alaranjada, polpa aquosa, é considerado um alimento saudável pela FDA (Food and Drug Administration - EUA). Seus principais nutrientes são as vitaminas C e B, potássio, fibras e ferro (ONJUS, 1998).

Conhecidas cientificamente por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, as laranjas doces, ilustradas na Figura 1, agrupam as principais variedades, que são a pêra, natal, valência, hamlin, bahia e baianinha, westin, rubi, folha murcha, seleta, lima, piralima e lima tardia. Dentre essas variedades, a que mais se destaca para o consumo *in natura* devido sua baixa acidez e paladar bem aceito principalmente por crianças e idosos é a laranja lima (CEAGESP, 2006).

**Figura 1-** Laranjas doces.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

O formato do fruto e a coloração variam conforme a variedade, normalmente com casca amarela, envolvendo polpa aquosa de coloração que pode variar de amarelo-claro a vermelha. O período de maturação está entre abril e setembro (CHEN et al., 1993).

O componente principal do suco de laranja são os carboidratos, possuindo mais de 70% dos sólidos solúveis. Em segundo lugar, vêm os ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico e málico, que representam até 10% dos sólidos solúveis. Os restantes são aminoácidos livres, bases nitrogenadas (6%), íons inorgânicos (aproximadamente 3%), vitaminas (2,5%), lipídios (1,2%), flavonóides (1,2%) e outros (HENDRIX e REDD, 1995).

A concentração dos compostos voláteis de suco de laranja pode ser modificada na fermentação etanóica devido à formação de álcoois, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas e ésteres pelo metabolismo das leveduras (SELLI et al., 2008).

A produção de laranja lima no Vale do Mundaú, além de Alagoas, atende ao mercado de Recife, Sergipe e Bahia. Contudo, não há investimentos no Estado para a modernização da cultura e escoamento da produção, o que dificulta a sua comercialização pela cultura ser exclusiva de pequenos agricultores e os frutos comercializados *in natura*, levando a perdas (COELHO, 2004).

O primeiro lugar de produção mundial de laranja vem, atualmente, sendo ocupado pelo Brasil, responsável por 80% da comercialização do suco concentrado e congelado (VENTURINI, 2005), cujo suco possui uma das melhores fontes de ácido ascórbico (AA) ou vitamina C da dieta alimentar (SHAW e MOSHONAS, 1991). Pode-se observar no Quadro 1 que, dentre os sucos cítricos, a laranja lima fica em terceira posição no teor de ácido ascórbico, enquanto o Quadro 2 mostra que, dentre as variedades de laranja, a laranja lima possui maior poder antioxidante.

**Quadro 1** – Teor de ácido ascórbico dos diferentes sucos cítricos.

Sucos de frutas	Teor de ácido ascórbico (g/L)
Acerola	1,254 ± 0,003
Butiá	0,687 ± 0,002
Laranja Lima	0,547 ± 0,006
Laranja Pêra	0,536 ± 0,014
Laranja Bahia	0,505 ± 0,003
Uvaia	0,482 ± 0,007
Araçá	0,393 ± 0,030
Maracujá	0,221 ± 0,012

Fonte: QUINÁIA e FERREIRA, 2007

O diferencial na laranja lima são o sabor doce, acidez pequena, suculência e aroma característico e agradável, sem ser forte. Os frutos, de forma arredondada e casca de espessura média, possuem cerca de 120 gramas e sua maturação está compreendida entre os meses de março a junho (COELHO, 2004).

**Quadro 2** – Capacidade antioxidante das diferentes variedades de laranja.

Amostra	Capacidade antioxidante (%)
Tangerina Ponkã	29,30 ± 1,43
Tangerina Murcote	12,78 ± 3,47
Laranja Pêra	49,15 ± 3,32
Laranja Lima	66,24 ± 2,35
Laranja Natal	51,28 ± 2,03
Laranja Valência	41,84 ± 0,49
Laranja Bahia	60,32 ± 2,62

Fonte: COUTO e CANNIATTI-BRAZACA, 2010

A cor da casca da fruta é uma das características utilizadas pelo consumidor na hora da compra. Porém, não indica, com segurança, a doçura do produto. Os frutos de cascas mais verdes, em geral, são cultivados em regiões mais quentes e são menos ácidos que os cultivados em clima mais ameno, que podem ser tão ou mais doces. O conteúdo de sólidos solúveis (°Brix) é o melhor em relação a outras frutas cítricas, devendo o da laranja lima ser no mínimo 10 °Brix (CEAGESP, 2006).

Os gomos da laranja são compostos de alvéolos, os quais contêm carboidratos, vitaminas A, B e C, sais minerais e substâncias ácidas. O produto mais consumido e apreciado da laranja é o suco, o qual pode ser usando para a fabricação de refrigerantes e sucos em pó. A casca possui essência oleosa. Quando seca, a casca é utilizada na preparação de geléias e licores. Das flores e folhas são aproveitados os óleos para a fabricação de perfumes e essências nas indústrias. Do albedo de frutas cítricas, pode-se extrair a pectina, produto de valor significativo no mercado. Além de propriedades como agente geleificante, espessante e estabilizante, a pectina pode ter ação terapêutica, uma vez que o seu consumo poderia reduzir os níveis de colesterol total e LDL, além de modelar a resposta glicêmica (BAKER, 1994).

## 2.2 Fermentação

Os processos fermentativos são utilizados pelo homem desde a Antiguidade. Apesar destes povos primitivos não conhecerem os princípios biológicos inerentes à produção ou conservação de muitos dos seus alimentos, passou a utilizar os efeitos surpreendentes e, durante muito tempo, inexplicáveis, destes processos em seu benefício, para conservar alimentos e preparar bebidas (AMORIM e LEÃO, 2005).

### 2.2.1 Fermentação etanóica

No Brasil, a classe social que mais consome vinho é a que possui renda e grau de instrução mais avançado (UFRGS, 2001), tendo se tornado cada vez mais acessível. As duas principais entidades que regulam a produção e o consumo de vinhos no Brasil são a União Brasileira de Vitivinicultura (UVIBRA) e o Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN).

Entre os anos de 2007 a 2011 as importações do vinho cresceram 30,7%, como mostra o Quadro 3, aumentando o consumo total de vinhos importados e vinhos finos, de 93,6 milhões de litros em 2010, para 96,8 milhões de litros em 2011, resultando em uma crescente preferência pela bebida (SATO, 2010), como pode ser observado no Quadro 4.

**Quadro 3 - Importações brasileiras de vinhos e espumantes, 2007 a 2011.**

Consumo em milhões de litros					
Ano / NCM	22041010 <sup>1</sup>	22041090 <sup>2</sup>	22042100 <sup>3</sup>	Outros <sup>4</sup>	Total
2007	1,12	2,13	57,41	0,22	60,88
2008	1,34	2,16	54,31	0,13	57,94
2009	1,37	1,83	55,75	0,16	59,13
2010	1,77	2,55	70,74	0,00	75,32
2011	1,92	3,01	72,40	0,00	77,32

<sup>1</sup>NCM 22041010 – Vinhos de uvas frescas, tipo champanha (champagne).

<sup>2</sup>NCM 22041090 – Outros vinhos de uvas frescas, espumantes e espumosos.

<sup>3</sup>NCM 22042100 – Outros vinhos, mostos de uvas cuja fermentação tenha sido impedida ou interrompida por adição de álcool, em recipientes de capacidade não superior a 2L.

<sup>4</sup>Outros – NCM 22042900 (outros vinhos, mostos de uvas, fermentação impedida por adição álcool.); NCM 22042911 (vinhos em recipientes de capacidade não superior a 5 L); NCM 22042919 (outros vinhos de capacidade superior a 5 L); NCM 22042920 (mosto).

Fonte: BRASIL, 2012.

O Brasil, a Argentina, o Paraguai e o Uruguai adotam, desde janeiro de 1995, a Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM), que tem por base o Sistema Harmonizado (SH), um método internacional de classificação de mercadorias, baseado em uma estrutura de códigos e respectivas descrições, criado para promover o desenvolvimento do comércio internacional, aprimorando a coleta, a comparação e a análise das estatísticas, particularmente as do comércio exterior.

**Quadro 4 - Consumo de vinhos finos no Brasil, 2007 a 2011.**

	Consumo (milhões de litros)				
	2007	2008	2009	2010	2011
Vinhos finos – Brasil	20,90	17,00	18,00	18,30	19,54
Importados	60,88	57,94	59,13	75,32	77,32
Total	81,78	74,94	77,13	93,62	96,86

Fonte: UNIBVA, 2012.

Nos países tropicais, frutas como laranja (CORAZZA et al., 2001), caju (GARRUTI et. al, 2002), mangaba (MUNIZ et al., 2002), banana (ARRUDA et al., 2003), cajá (DIAS et al., 2003), jabuticaba (CHIARELLI et al., 2005), acerola (SANTOS et al., 2005), maçã (FERTONANI et al., 2006), goiaba, damasco, abacaxi e manga podem fornecer vinhos valorizados e saborosos devido a tendência de aceitação em pesquisas de consumo e contribuição para redução de perdas pós-colheita de frutos perecíveis (SANDHU e JOSHI, 1995).

De acordo com a Lei nº 7678, a denominação de vinho é privativa da uva, sendo vedada sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras matérias-primas. A Legislação do Ministério da Agricultura, decreto nº 2.314 (BRASIL, 1997), estabelece que fermentado de fruta é a bebida com graduação etanólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida da fermentação etanólica do mosto de fruta sã, fresca e madura.

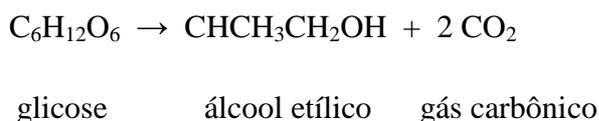
Para o início de um processo fermentativo, realiza-se, primeiramente, a preparação do mosto, matéria-prima açucarada que, segundo Moretto (1988), é definido

como o caldo ou suco obtido das frutas, depois de espremidas, para a elaboração de vinhos ou fermentados.

O mosto, matéria-prima açucarada para realização da fermentação etanólica, assim que é obtido e homogeneizado, deve ser adicionado de açúcar, sendo uma operação corrente e sempre necessária (AQUARONE et al., 1983).

Depois de obtida a padronização do mosto da fruta, realiza-se fermentação etanólica, sob condições de anaerobiose, cujo agente fermentativo é a levedura e os principais produtos formados são o etanol e o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Para se conseguir um aroma agradável no produto final, recomenda-se o uso de uma cultura pura da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

No processo de fermentação etanólica, os açúcares são transformados em etanol e gás carbônico em proporções equimolares, conforme a equação de Gay-Lussac.



As leveduras podem fazer uso da fermentação tanto em condições de anaerobiose, como em condições de aerobiose. O metabolismo das leveduras é desviado em condições de anaerobiose para a fermentação etanólica, sendo excretado etanol em todo processo. A respiração é realizada pelas leveduras, em condições aerobiose, levando a formação dezoito vezes maior de ATP que na fermentação etanólica (VASCONCELOS, 1998).

Durante a fermentação, são produzidos componentes voláteis como acetaldeído, acetona, éster-acetato de metila e etila, sendo estes os compostos responsáveis pelo aroma, ativando as sensações olfativas (MAMEDE E PASTORE, 2007). O acetaldeído (etanal) é um produto do metabolismo primário da fermentação, produzido por meio de aminoácidos e oxidação do etanol. A acetona encontra-se em concentrações de 3 a 32 mg/L (HASHIZUME, 2011). Dos ésteres, o acetato de etila é o que apresenta maior concentração, com teores entre 50 e 80 mg/L, contribuindo para o aroma agradável do vinho (HASHIZUME, 2001; SALTON, 2000). De acordo com Oliveira (2001), concentrações de acetato maiores que 200 mg/L confere em sabor de vinho danificado.

Chagas et al (2008) citam que o tempo de fermentação dura semanas. Porém, em seu trabalho sobre fermentação etanólica em mel diluído, buscou reduzir o tempo do processo, respeitando o sabor do produto final. De forma semelhante, Mendes (2001) realizou fermentação etanólica com laranja, levando 7 dias de processo. Mamede e Pastore (2007) estudaram a produção de compostos voláteis no mosto de uva, em 7 dias de fermentação. Em relação à temperatura de processo, Moreira (2001) cita que vinhos produzidos entre 15 a 18°C, ou seja, em processos de baixa fermentação, resultam na síntese de sabores desagradáveis.

Os vinhos ou fermentados de frutas são divididos em três classes, no que se refere à quantidade de açúcares residuais. A primeira classe, dos vinhos do tipo seco, possuem até 5 g/L de açúcar; a segunda, do tipo meio seco, entre 5 e 20 g/L; e a terceira classe, dos vinhos suaves, com mais de 20 g/L (RIZZON et al., 1994).

### 2.2.2 Fermentação acética

A elaboração de vinagre é realizada após a fermentação etanólica. Refere-se a um processo envolvendo a oxidação do etanol e a formação de ácido acético, com consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>), ocorrendo liberação de grandes quantidades de energia (ZILIOLI, 2011).



etanol    oxigênio    ácido acético    água

O meio utilizado para a acetificação, isto é, a transformação do etanol em ácido acético por ação de bactérias acéticas, não deve possuir cheiros e gostos estranhos, além de ser são e potável, para que assim a fermentação acética resulte em um vinagre de boa qualidade.

O fermentado etanólico é inoculado com uma cultura mista de bactérias adicionando-se “vinagre forte”, que é o vinagre não diluído e não pasteurizado de uma fermentação anterior, contendo altas concentrações de bactérias acéticas.

Industrialmente, a conversão de 1 g de etanol a 1 g de ácido acético (rendimento de 76,7%) é considerada econômica. Em laboratórios, utilizando-se frascos agitados, atinge-se 100% de rendimento (AQUARONE et al., 1983).

A acetificação do fermentado etanólico com vinagre de boa qualidade, não pasteurizado (vinagre forte) dá-se facilmente, até mesmo espontaneamente, desde que sejam observados alguns requisitos básicos, como teor etanólico, acidez, concentração de nutrientes, temperatura, oxigenação e tempo de fermentação. Tais condições são detalhadas a seguir:

- I. Teor etanólico – O meio deve possuir teor etanólico entre 8 e 10°GL, apesar de novas técnicas de fermentação acética conseguirem utilizar vinhos entre 10 e 12°GL. O processo de acetificação se torna lento e difícil quando se utilizam meios com graduação etanólica muito elevada, podendo levar, em alguns casos, a problemas de parada do processo devido à ação inibidora do etanol ou do próprio ácido acético presente. A utilização de meios pouco etanólicos origina vinagres de baixa acidez e pouca qualidade sensorial, além de apresentar custo elevado de produção. Meios com grau etanólico inferior a 4°GL favorecem a contaminação, originando vinagres fracos, com concentração de ácido acético inferior a 4% (EMBRAPA, 2008).
- II. Acidez inicial – A acidez inicial deve estar entre 2 e 3% de ácido acético, que pode ser conseguido acrescentando 25 a 30% de um vinagre forte, adicionado após o término da fermentação etanólica. Para processos lentos, a concentração acética inferior a 2% e, para processos submersos, a concentração acética de 1%, resultam em uma fermentação muito longa, ocasionando maiores perdas de etanol por evaporação, além de favorecer contaminações. Uma concentração acética superior a 3% é tóxica para as bactérias na fase inicial de acetificação (EMBRAPA, 2008).
- III. Concentração de nutrientes – O meio deve conter, no mínimo, algumas vitaminas do complexo B (ácido pantotênico, ácido P-aminobenzóico, ácido nicotínico), substâncias nitrogenadas (aminoácidos, hidrolisado de proteína, sais de amônio) e diversos elementos (Mg, K, Na, Ca, S, Fe, Mn). Quando se utiliza meio de frutas ou malte como matéria-prima, estes

normalmente já contêm os fatores de crescimento necessários à fermentação acética.

- IV. Temperatura – A maioria das bactérias acéticas apresentam ótima atividade entre 25 e 30 °C. Temperaturas mais altas podem ser usadas se a concentração total (GK = concentração de ácido + concentração de etanol) for baixa, e vice-versa.
- V. Oxigenação – O fornecimento adequado de oxigênio, por meio da aeração, influencia o sucesso da fermentação acética. Teoricamente, 1 kg de etanol necessita de 0,69 kg de oxigênio ou, aproximadamente, 3,5 kg de ar. Devido a essas grandes quantidades exigidas de ar deve-se, dentro dos limites, favorecer ao máximo o fornecimento de ar e sua transferência às bactérias acéticas, lembrando que a evaporação do etanol aumenta com a aeração (AQUARONE et al., 1983).
- VI. Tempo de fermentação – O tempo de fermentação é variável em cada processo utilizado e deve ser conhecido, pois a permanência das bactérias acéticas no vinagre pronto, após o consumo do etanol, pode ocasionar perda da acidez devido ao consumo do ácido acético por esses próprios micro-organismos.

### 2.3 Vinagre

O vinagre, assim como o vinho, é conhecido desde a antigüidade. O seu nome, em quase todas as línguas ocidentais, excetuando-se o italiano (*aceto*, do latim *acetum*) e o alemão (*essig*), provém do francês *vinaigre*, que significa vinho azedo.

No século XIX, o vinagre era derivado da acetificação espontânea do vinho, sendo, por isso, conhecido como “vinho azedo” (TESFAYE et al., 2002). Originalmente, foi obtido não apenas de vinho, mas de cervejas deixadas ao ar, formando-se um produto por fermentação espontânea (AQUARONE et al., 1983; MORETTO et al., 1988; SACHS, 1990).

Uma solução diluída de ácido acético a 4% é conhecida como vinagre. Ele é um líquido azedo e adstringente, bastante usado como condimento e conservante. É

produzido por vários tipos de matérias-primas, como frutas e materiais açucarados e ricos em amido. Primeiro, ocorre a fermentação etanóica desta matéria-prima para, depois, ocorrer a fermentação acética, resultando no vinagre. Muito simples de ser preparado, o vinagre é dotado de uma vasta gama de vitaminas, minerais, aminoácidos essenciais e várias enzimas.

O homem utiliza o vinagre há milhares de anos (EMBRAPA, 2008). Como condimento, atribui gosto e aroma a certos alimentos, tornando-os mais saborosos e menos fibrosos, a exemplo de saladas e maioneses. Em outros alimentos, também age como conservante, contra fungos (bolors) em pães, panetones e biscoitos, e agente de amaciamento, como acontece nas carnes temperadas e legumes em conserva. Além disso, exerce função como agente de limpeza, em materiais metálicos (prata, alumínio, latão) com a finalidade de clareá-los.

Por ser uma solução econômica e de fácil acesso, é utilizado também como antisséptico, na cura de feridas e úlceras, devido a sua propriedade desinfetante e antiinflamatória, na preparação de soluções medicamentosas (vinagre canforado para dores musculares, contusões e distensões, solução para gargarejos em casos de infecções da boca e garganta) e, ainda, como solução espermicida, germicida, inseticida e solvente, além de neutralizador de odores (AQUARONE et al., 1983), apresenta efeitos fisiológicos, regulando a glicose sanguínea (EBIHARA; NAKAJIMA, 1988; JOHNSTON; BULLER, 2005), controlando a pressão arterial, auxiliando a digestão, estimulando o apetite (XU; TAO; AO, 2007) e promoção da absorção de cálcio (HADFIELD; BEARD; LEONARD-GREEN, 1989; XU; TAO; AO, 2007).

A primeira atuação como desinfetante ocorreu na Europa, durante as epidemias de cólera, onde todas as frutas e hortaliças eram aconselhadas a serem lavadas com vinagre antes do consumo. O vinagre não apresenta apenas ação antisséptica contra a cólera, mas também em relação à *Salmonella* spp. e outros patógenos do intestino, que causam infecções e epidemias (EMBRAPA, 2008).

Pasteur trouxe melhorias na produção de vinagre, através do método original, conhecido como lento, Orleans ou francês (TESFAYE et al., 2002), mostrando que encher os acetificadores com material poroso serviria de suporte para o desenvolvimento de bactérias acéticas, não levando à acetificação como se pensava. Os substratos não se acetificavam em contato com o ar e, sim, através da oxidação direta, havendo

necessidade, sempre, da participação das bactérias acéticas. Como em outros campos da ciência, o vinagre foi elaborado e utilizado pelo homem antes que se conhecessem as transformações que ocorriam (AQUARONE et al.,1983).

O vinagre pode ser preparado através de solução aquosa contendo açúcar ou etanol onde, após diluição e correção da concentração de outros nutrientes, é fermentado.

Os vinagres de frutas conservam o sabor e aroma da matéria-prima de origem, resultando assim em melhor qualidade sensorial e nutritiva (LU et al., 1999), por conter vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos (AQUARONE; ZACANARO JÚNIOR, 1983), além do gosto picante dado pelo ácido acético que, juntamente com os ésteres formados durante o envelhecimento, serão responsáveis pelo seu buquê (SACHS, 2001).

Os compostos voláteis contidos no vinagre assumem importância no aroma (CHARLES et al., 2000) e podem ser determinados através da análise sensorial. Todavia, existe limite dessa técnica devido à pungência do ácido acético (SU; CHIEN, 2010).

O vinagre produzido através de fermentados de frutas é um produto que consegue, dependendo do tipo de produção, gerar alto grau de apreciação entre os consumidores (ZILIOLI, 2011). Existem frutos que fornecem vinagres de qualidade comparáveis aos de uva, a preços mais baixos e que, provavelmente, ainda não são utilizados na produção de vinagres comerciais. O encarecimento do transporte, devido à crise do petróleo a partir de 1973, começou a incentivar a produção de vinagres de frutos regionais, como, por exemplo, laranja, abacaxi, caqui, caju, etc (AQUARONE et al., 1983).

#### **2.4 Legislação e composição do vinagre**

Todos os produtos resultantes da fermentação acética de diversos substratos etanólicos são denominados de vinagre. Acompanhado do nome vinagre, segue-se o nome do substrato correspondente. Pela legislação brasileira, estabelecida pelo Ministério da Agricultura no Decreto-Lei nº 174, de 8 de maio de 2007, vinhos elaborados com outras frutas devem, obrigatoriamente, ser rotulados com a denominação vinho acompanhada do nome da fruta da qual se originou, a exemplo do vinho de laranja, vinho de pêra, vinho de

abacaxi, etc. Os vinagres brasileiros também possuem esta característica, sendo classificados de acordo com o Quadro 5.

**Quadro 5** - Classificação dos vinagres brasileiros.

TIPO DE VINAGRE	CARACTERÍSTICAS
Vinagre de vinho tinto	Obtido através da fermentação acética do vinho tinto
Vinagre de vinho branco	Obtido através da fermentação acética do vinho branco
Vinagre de maçã	Obtido através da fermentação acética do vinho de maçã
Vinagre de álcool	Obtido através da fermentação acética do etanol

Fonte: BELMONT, 2002

A legislação brasileira estabelece que os fermentados de frutas devam possuir graduação entre 10 e 13°GL, adquiridos através da fermentação do mosto de frutas frescas e sadias, podendo adicionar sacarose no máximo igual à dos açúcares da fruta (AQUARONE et al., 1983). O produto da fermentação acética do vinho deve possuir acidez volátil mínima, expressa em ácido acético, de 40 g/L, ou seja, 4%, graduação etanólica inferior a 1°GL e ser, obrigatoriamente, pasteurizado. Uma acidez volátil superior a 80 g/L é um concentrado de vinagre, usado apenas para diluição. Estabelece, também, valor mínimo de 7 g/L de extrato seco para vinagres de vinho tinto e rosados e 6 g/L para vinagres de vinho branco. Para o teor de cinzas, preconiza um valor mínimo de 1 g/L (COSTA et al., 2006). Ingredientes opcionais, a exemplo de ervas, especiarias, sal, entre outros, devem estar em proporção suficiente para conferir um sabor e aroma peculiar, conforme especificação do Codex Alimentarius.

A produção de vinagres, através da diluição de ácido acético de origem não fermentativa, é proibida, conforme a legislação vigente (BRASIL, 1999). O vinagre deve apresentar características sensoriais próprias, sendo proibida pela legislação brasileira a produção através da síntese de ácido acético, como também a designação de vinagre sem o nome do substrato (EMBRAPA, 2008).

Quanto às características organolépticas, a legislação (BRASIL, 1974) caracteriza os vinagres como produtos com aspecto líquido límpido e sem depósito, coloração conforme a matéria-prima que lhe deu origem, cheiro característico e sabor ácido, próprio.

Como em geral o vinagre resulta de duas fermentações, a etanóica seguida da acética, toda a matéria-prima usada na produção fermentativa de álcool será utilizada como matéria-prima do vinagre. Os vinagres obtidos de frutos ou malte possuem composição mais ampla do que os vinagres de etanol, pois possuem quase todas as substâncias solúveis contidas na matéria-prima, ou que se formaram durante os processos fermentativos, dando sabor, odor e cor característicos. Já o vinagre de etanol, possui apenas as substâncias provenientes do destilado etanólico, as formadas na fermentação acética e outras adicionadas como nutrientes.

O vinagre de frutas, ao ser utilizado como alimento, é mais nutritivo, pois contém mais substâncias assimiláveis pelo organismo, como vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos, originários do fruto e da fermentação etanólica de que proveio (AQUARONE et al., 1983).

Para o controle de qualidade do vinagre, devem ser observados, principalmente, os teores de ácido acético, etanol residual, extrato seco e cinzas.

#### 2.4.1 Ácido acético

O ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), substância com densidade de 1,049 g/mL, provém da oxidação do etanol contido no fermentado etanólico durante processo de acetificação, sendo este o principal componente dos vinagres, seja qual for o substrato etanólico utilizado. Sua concentração é dada em graus acéticos (gramas de ácido acético por 100 mL de vinagre) (CARBONELL, 1970; MECCA et al., 1979; AQUARONE et al., 1983; LLAGUNO e POLO, 1991), devendo o produto, para consumo humano, estar entre 4 e 6% de ácido acético.

A transformação do etanol em ácido acético, por meio das bactérias acéticas, não é capaz de produzir altas concentrações deste ácido, visto que o mesmo inibe o desenvolvimento das bactérias. Por isso, durante a acetificação, não se consegue altas concentrações do mesmo. Em alguns casos, utilizam-se bactérias selecionadas para obter concentrações de até 12% (LLAGUNO e POLO, 1991).

#### 2.4.2 Álcool etílico (etanol) residual

O grau etanólico do vinagre representa o resíduo do processo de acetificação. Todo vinagre deve ter um pouco de etanol pois, caso contrário, as bactérias acéticas, na ausência do substrato etanólico, podem degradar o ácido acético produzido, o que torna o processo antieconômico (MECCA et al., 1979; AQUARONE et al., 1983; LLAGUNO e POLO, 1991).

Nos processos industriais mais modernos, consegue-se a produção de vinagres com pequenas concentrações de etanol, sendo bastante eficientes. Nos processos artesanais, ao contrário, não é possível e nem recomendado toda a utilização do etanol do vinho, pois o teor residual de etanol (2 a 3°GL) irá produzir ésteres durante o envelhecimento do vinagre (LLAGUNO e POLO, 1991).

A legislação brasileira estabelece 1°GL de etanol residual máximo para o vinagre (BRASIL, 1990).

#### 2.4.3 Extrato seco

O extrato seco do vinagre de vinho é formado por substâncias não voláteis, como glicerina, substâncias pécnicas, substâncias nitrogenadas, entre outras.

No passado, para evitar fraudes, determinava-se o extrato seco, visto que concentrações elevadas ou baixas indicavam adulterações. Quando o produto apresentava concentração baixa significava que foi diluído com água ou com soluções de ácido acético, enquanto alta concentração indicava acréscimo de substâncias não voláteis, as quais aumentam o resíduo seco (LLAGUNO e POLO, 1991).

Segundo Mecca (1979), é normal valores entre 10 e 25 g/L de extrato seco para vinagres de vinho. A legislação espanhola estabelece um valor mínimo de 1,55 g/L e um valor máximo de 3,2 g/L para o teor de extrato seco de vinagres de vinho (LLAGUNO e POLO, 1991). Já a legislação brasileira, o valor mínimo é de 7 g/L para vinagres de vinho tinto e 6 g/L para vinagres de vinho branco (BRASIL, 1990).

#### 2.4.4 Cinzas

O teor de cinzas determina os minerais contidos no produto e é um dos fatores de investigação da adulteração no vinagre. Um valor muito baixo no teor de cinzas significa que o vinagre foi diluído e, em seguida, reconstituído com ácido acético. Um alto teor, por sua vez, indica acréscimo de substâncias não voláteis.

A legislação brasileira estabelece um valor mínimo de 1 g/L (BRASIL, 1990), enquanto a legislação espanhola prevê valores aceitáveis dentro dos limites de 1 a 5 g/L (LLAGUNO e POLO, 1991).

### 2.5 Bactérias acéticas

Um dos grandes grupos de interesse econômico para a produção de vinagre são as bactérias acéticas. Segundo Pedroso (2003), são as bactérias acéticas, por aerobiose, que oxidam o etanol a ácido acético durante a fermentação acética.

As bactérias do ácido acético são Gram-negativas ou Gram-variáveis, aeróbias, não formadoras de esporos, catalase positiva e na forma de bastonetes elipsoidais, que podem ocorrer sozinhos, em pares ou em cadeias. Para o crescimento, a faixa ótima de pH é de 5 a 6,5, mas podem crescer em valores de pH entre 3 e 4. As principais representantes das bactérias acéticas pertencem ao gênero *Acetobacter* e são usadas desde os primórdios para a produção do vinagre por fermentação (BILSKA, 1996), sendo considerada mais eficiente para o processo e conferindo o gosto característico de vinagre.

O melhor rendimento para um processo com a bactéria *Acetobacter* se dá com temperatura entre 25 e 30°C, apesar de suportarem temperatura mínima de 4 a 5°C e máxima de 43°C (EMBRAPA, 2008), sendo responsável pelo azedamento do vinho ao transformar o etanol em ácido acético (MADRID et. al., 199).

Estas bactérias podem ser encontradas em flores, frutas, mel, saquê, tequila, vinho de palma, grapa, cidra, cerveja, kefir, vinagre, aparas de madeira usadas em acetificadores de vinagre pelo processo rápido, caldo de cana, solo de jardins e canal de água. Linhagens de *Acetobacter* causam a doença rosa em abacaxi e podridão em maçãs e pêras. Deve-se salientar também que a bactéria acética usada na fabricação de vinagre é

deteriorante em cervejas e vinhos (DE LEY et al., 1984, HOLT et al., 1994, SWINGS, 1992 apud SPINOSA 2002).

As bactérias do gênero *Gluconobacter*, também produtoras de ácido acético, apresentam semelhanças com as bactérias do gênero *Acetobacter*. Suas células são elipsoidais ou em forma de bastões, ocorrem sozinhas ou em pares, raramente em correntes, sendo Gram negativas, raramente Gram variáveis. A temperatura de crescimento ideal está na faixa de 25 a 30°C, não crescendo em temperatura superior a 37°C. O pH ótimo está na faixa de 5,5 à 6,0, apesar de a maioria das cepas crescerem em pH 3,6. As cepas são encontradas nas mesmas fontes que as bactérias *Acetobacter* (DE LEY et al., 1984 apud HOLT et al., 1994).

As bactérias de interesse industrial são *Acetobacter aceti*, *A. xylinoides*, *A. orleanense*, *A. acetigenum*, *A. schuetzenbachii*, *A. curvum* e *A. rances* (AQUARONE et al., 1983). Necessitam de nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, cálcio e magnésio para seu desenvolvimento, além de pequenas concentrações de ferro e manganês. No entanto, nas matérias-primas naturais, a adição de nutrientes pode não ser necessária (AQUARONE, 1983). Elas, também, carecem do oxigênio do ar durante a acetificação, fazendo com que sua multiplicação ocorra na superfície do meio em transformação, resultando em um véu de espessura variável de acordo com o tipo de bactéria, conhecido como "mãe do vinagre".

A fermentação acética se torna lenta em temperaturas inferiores a 15°C e superiores a 35°C, reduzindo a atividade bacteriana. A maior parte das espécies suporta até 11°GL e 10% de ácido acético. As bactérias consideradas ideais são as que resistem à elevada concentração etanólica e de ácido acético, possuem pouca exigência nutritiva, elevada velocidade de transformação do etanol em ácido acético, bom rendimento de transformação, sem hiperoxidar o ácido acético formado, além de conferir boas características gustativas ao vinagre.

## **2.6 Processos de fabricação**

São três os principais processos utilizados para a fabricação de vinagre: o método lento, também conhecido como processo Orleans, o método rápido, também denominado processo Alemão, e o processo submerso, este último bastante utilizado pela indústria de

vinagre (AQUARONE; ZANCANARO JR, 1990; MORETTO et al., 1988; PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001; TESFAYE et al., 2002; SANTOS, 2009).

### 2.6.1 Processo Orleans

É o processo mais antigo, observado a partir do azedamento lento do substrato etanólico (vinho, cerveja, hidromel, etanol de batata e etanol de cana-de-açúcar) em contato com o ar, em barricas semi-cheias (AQUARONE e ZANCANARO, 1990; ZANCANARO, 1988; MORETTO et al., 1988; EMPRAPA, 2006).

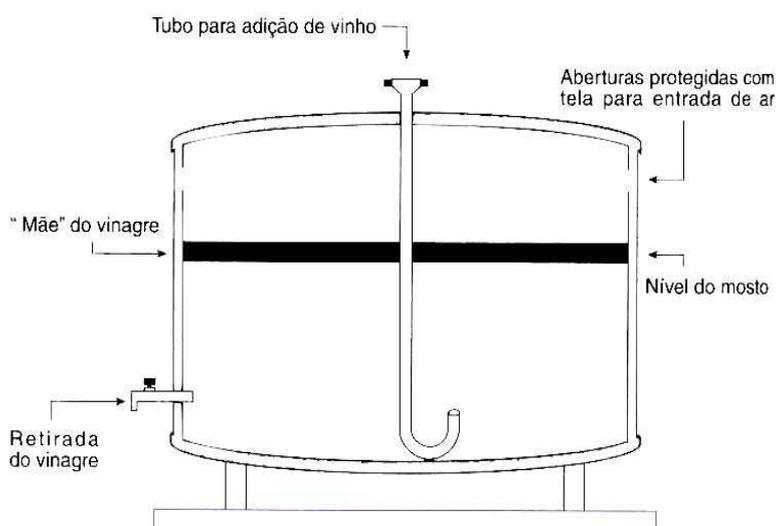
Neste processo, a transformação de etanol em ácido acético ocorre pelo acréscimo de um pouco de vinagre não pasteurizado, ou uma porção de uma massa gelatinosa (mãe do vinagre), onde estão presentes as bactérias acéticas, a uma porção de vinho. De tempos em tempos, o substrato é renovado, retirando-se o vinagre com 4 a 5% de ácido acético e certa quantidade de etanol, sem acetificar (XAVIER et al., 2009).

O nome Orleans vem da principal indústria vinagreira do século XVII, localizada em Orleans, na França (LLAGUNO e POLO, 1991). O processo de Orleans, também conhecido como lento, superficial, estacionário ou francês, surgiu em 1670 e consiste em favorecer o contato do ar com uma fina camada gelatinosa, que se mantém na superfície do vinho. Produz vinagre de excelente qualidade, empregando somente fermentado como matéria-prima (FERRAZ e PEDROSO, 2003).

O processo de elaboração do vinagre é realizado em barril de madeira adaptado e designado de acetificador ou vinagreira, ilustrado na Figura 2. Adiciona-se cerca de 10% do volume total de um vinagre de qualidade e não-pasteurizado, contendo as bactérias acéticas ativas, que irão funcionar como pé-de-cuba. Não se faz necessária a adição de substâncias nutritivas para o desenvolvimento das bactérias acéticas, visto que elas estão presentes naturalmente no meio a fermentar. Um pedaço de madeira apropriada é colocado na superfície do mosto para sustentar as bactérias oxidativas, juntamente com o polímero  $\alpha$ -celulose, que elas próprias produzem a partir de resíduos de açúcar contidos no vinho. Este polímero, tecnicamente denominado de zoogléia e chamado de “mãe do vinagre”, deve se posicionar na superfície do meio em acetificação, pois, em caso de afundamento, atrasa o processo por dificultar o contato do oxigênio com o micro-organismo e também a retirada do produto. Uma torneira ou sifão foi colocada abaixo da

zoogléia, para tornar possível a retirada de vinagre e ainda para a adição do mosto, sem perturbar a película bacteriana. Retiradas de vinagre e adição de vinho são realizadas em quantidades e períodos de tempo ajustados, a fim de que o processo se torne semi-contínuo (MECCA et al., 1979; AQUARONE et al., 1983; LLAGUNO e POLO, 1991, SPINOSA, 2002).

**Figura 2** – Modelo de vinagreira do processo lento.



Fonte: AQUARONE et al., 1983.

O vinagre obtido não deve conter mais de 1°GL. Caso isso ocorra, deve-se aguardar mais alguns dias de fermentação (AQUARONE et al., 1983). O processo lento e a presença de etanol residual conferem ao vinagre aroma e sabor especial devido à formação de ésteres e outros compostos voláteis, ou seja, o mesmo passa por um processo de envelhecimento durante sua elaboração (MECCA et al., 1979; LLAGUNO e POLO, 1991).

Algumas medidas de controle foram desenvolvidas para um melhor aperfeiçoamento do processo lento, como a faixa de temperatura entre 20 e 25°C para que a acetificação ocorra de forma mais rápida, evitando, assim, perdas de etanol por evaporação, retirada periódica do vinagre, adição do fermentado etanólico, além de se trabalhar com maior teor de acidez possível e ambiente escuro para evitar contaminação por fungos (MARTINELLI FILHO, 1982; WOOD, 1998; AQUARONE et al., 2001).

As dimensões dos barris são estabelecidas em função da quantidade de vinagre a elaborar. As aberturas para passagem do ar deverão ser protegidas por uma tela fina, evitando-se a presença de moscas e outros insetos que são atraídos pelos odores do vinagre (AQUARONE et al., 1983).

As vantagens do processo descrito é a produção de um vinagre de boa qualidade, praticamente límpido, considerado superior à do obtido por outros métodos. Isto ocorre em função do amadurecimento natural no vinagre, antes de sua retirada, reduzindo o sabor picante, próprio dos vinagres recém produzidos, e tornando o líquido mais suave e mais agradável. O produto final é obtido a partir de uma simples filtração, seguida de pasteurização a 65°C por 5 minutos e envase a quente (AQUARONE et al., 1983; PALMAS, CARVALHO e GAVÓGLIO, 2001; TESFAYE et al., 2002; ZILIOLI, 2011).

Entre os principais aspectos negativos do processo estão o baixo rendimento da transformação do etanol em ácido acético, o grande espaço ocupado e a baixa produtividade, sendo inviável comercialmente e usado, praticamente, apenas na produção doméstica de vinagre.

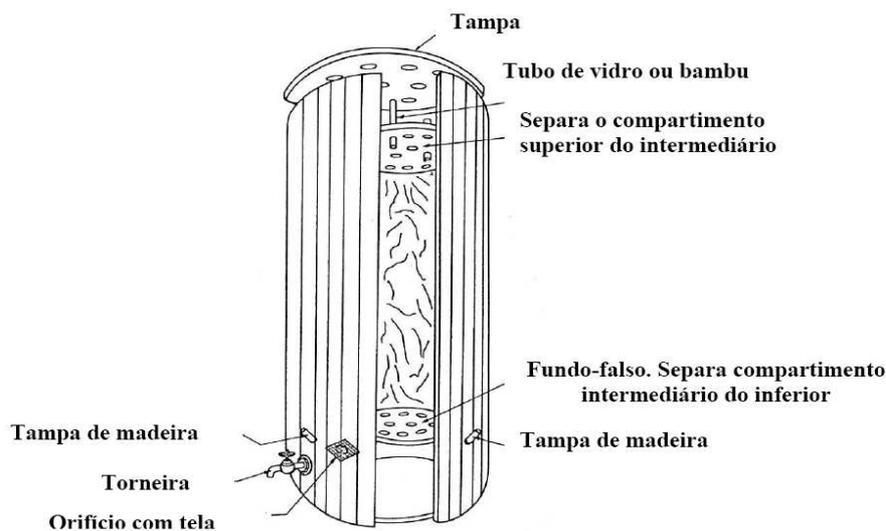
### 2.6.2 Processo Alemão

Também chamado de *Schützenback* ou *Boerhave*, o sistema de produção por meio de gerador é talvez o mais comum, em se falando do processo rápido. O método surgiu na Alemanha, no início do século XIX, originado da observação da importância da aeração no processo lento (LLAGUNO e POLO, 1991), sendo muito utilizado na produção industrial por se trabalhar em grande escala (AQUARONE e ZANCANARO JÚNIOR, 1990).

O equipamento, ilustrado na Figura 3, é conhecido por gerador de vinagre ou vinagreira, de construção normalmente em madeira, embora possa ser usado aço inoxidável, alvenaria ou outro material que não seja atacado pelo ácido acético ou confira propriedades estranhas ao vinagre. Constitui-se de três câmaras ou compartimentos. A superior, por onde entra o líquido, tem a função de distribuir a mistura em acetificação sobre o material de enchimento contido na câmara intermediária. A intermediária, que possui o material de enchimento (sabugo de milho, bagaço de cana, carvão vegetal, tiras de madeira, pedras, cerâmicas em pedaços ou outro), é a maior. Deve-se tomar o cuidado

deste material não conferir sabor, cor e odor estranhos ao vinagre, uma vez que está sujeito à formação de uma grande superfície de exposição, permitindo o desenvolvimento das bactérias acéticas. A inferior, por onde o vinagre é retirado, funciona como depósito, de onde o líquido a ser avinagrado (mosto etanólico ou vinho) é recirculado para a câmara superior por meio de um alimentador automático, tantas vezes quantas necessárias, de forma gotejante sobre o material de suporte da câmara central, onde ocorrerá a acetificação. Da câmara central, novamente por gotejamento, o líquido passa para a parte inferior de onde é retirado como vinagre bruto para clarificação, pasteurização e envase (MARTINELLI FILHO, 1982; MORETTO et al., 1988; AQUARONE e ZANCANARO JÚNIOR, 1990)

**Figura 3** – Modelo de vinagreira do processo rápido.



Fonte: MARTINELLI FILHO, 1982.

O início do processo é realizado do mesmo modo que no processo lento, adicionando-se aproximadamente 10% de vinagre não pasteurizado. A mistura do substrato e vinagre, quando passa através do suporte, recebe ar de baixo para cima, movimentando-se nesse sentido por conta do calor liberado durante a transformação. O tempo de processo, em geral, é de 10 dias para que se possa retirar 10% do volume colocado inicialmente para avinagramento (SPINOSA, 2002; EMBRAPA, 2008).

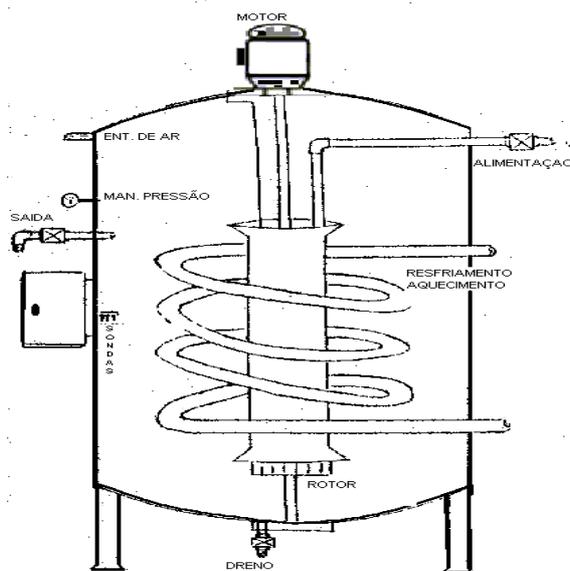
O vinagre obtido é praticamente límpido, visto que as substâncias que causariam turbidez são retiradas junto ao material de suporte. A filtração é feita em filtro-prensa, seguida de pasteurização e envase (AQUARONE et al., 1983).

Os fatores negativos do processo rápido são a elevada perda de substâncias voláteis por evaporação, o material de suporte, normalmente marvalha de madeira, o qual se contamina facilmente e, quando novo, requer um pequeno acondicionamento até a impregnação de vinagre.

### 2.6.3 Processo submerso

O baixo valor agregado ao vinagre e a forma de produção artesanal das fábricas tornou desacelerado o desenvolvimento das indústrias vinagreiras. Na Alemanha, em 1932, Henrich Frings-Bonn desenvolveu e colocou em prática um acetificador com controle de temperatura, aeração forçada e renovação semi-contínua da carga de substrato-vinagre. Em 1950, esse equipamento sofreu modificações e ficou conhecido como acetificador Frings, ilustrado nas Figuras 4 e 5, substituindo os modelos de processo rápido (LLAGUNO e POLO, 1991).

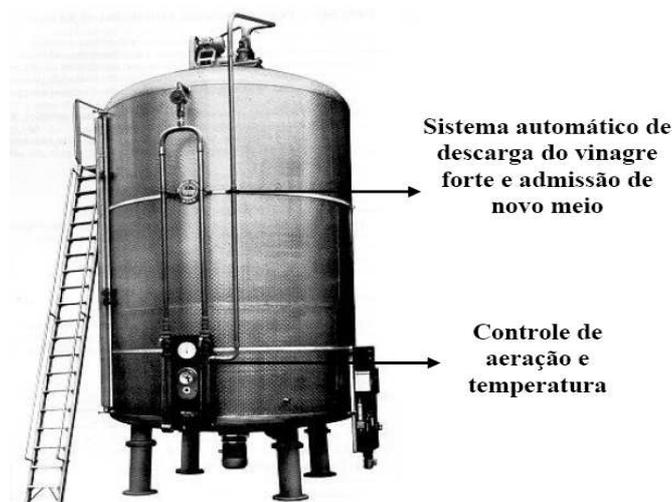
**Figura 4** – Desenho de um acetificador Frings.



Fonte: SACHS, 2001.

No processo submerso, a produção de ácido é realizada na presença dos micro-organismos submersos no líquido a ser acetificado e com um suprimento abundante de ar. O processo de transformação leva, em média, 20 horas, sendo considerado de alta eficiência (AQUARONE et al., 1983; CASTELO, 2011).

**Figura 5** – Visualização de um acetificador Frings.



Fonte: MENEGUZZO e RIZZON, 2006.

O acetificador Frings consiste na fermentação em tanques de aço inoxidável com capacidade de 10000 a 40000L, sendo possível produzir cerca de 2,5 g/Lh de vinagre e diminuir as perdas por evaporação de 3 a 5%. Nesse acetificador, pode-se fabricar tanto vinagre de vinho como de etanol, com concentrações iniciais de álcool de 4 a 13°GL, obtendo um vinagre com concentrações até 10%, alcançando um rendimento até 94% (LLAGUNO e POLO, 1991; PALMAS, CARVALHO e GAVÓGLIO, 2001; TESFAYE et al., 2002).

A diferença entre esse processo e o rápido é o fato das bactérias acéticas estarem submersas no líquido a fermentar, sem nenhum material de suporte (LLAGUNO e POLO, 1991).

No final da produção, obtêm-se um vinagre bruto bastante turvo, devido à suspensão das bactérias acéticas e das substâncias sólidas (MECCA et al., 1979; AQUARONE et al., 1983; LLAGUNO e POLO, 1991), necessitando da adição de

agentes clarificantes, filtração especial e pasteurização antes de seu acondicionamento (PALMAS; CARVALHO, GAVÓGLIO, 2001; TESFAYE et al., 2002).

As vantagens de se utilizar este processo estão na rapidez da produção do vinagre, na uniformidade do produto, na melhor adequação dos acetificadores ao molde industrial, na automação e no manuseio facilitado, sendo, então, o método mais empregado industrialmente para elaboração de vinagres em larga escala (MECCA et al., 1979; AQUARONE et al., 1983; SPINOSA, 2002; TESFAYE et al., 2002).

Sua desvantagem está na oxigenação, que deve ser contínua, íntima e adequada em todos os pontos do tanque, pois pequenas interrupções, principalmente nas fases finais de fermentação, podem afetar bastante o rendimento (LLAGUNO e POLO, 1991).

#### 2.6.4 Processamento final do vinagre

Antes de comercializar o vinagre, o mesmo deve passar por alguns tratamentos que o tornem límpido e estável. Essas etapas são a clarificação, a filtração, o envelhecimento, a estabilização e o envase.

Ao término da fermentação, o vinagre deve ser retirado da vinagreira e acondicionado em recipientes apropriados sem a presença do ar, para que as bactérias possam ser inibidas. Caso isso não ocorra, as bactérias, por falta de etanol para metabolizar, oxidam o ácido acético, fazendo o processo inverso ao de acetificação (SACHS, 1990).

A clarificação tem a função de eliminar substâncias que causam turbidez ou adstringência, que influenciam negativamente no sabor e na aparência. Os processos empregados são o espontâneo ou autoclarificação, mecânico ou centrifugação e físico-químico, que utilizam substâncias orgânicas e inorgânicas, como gelatinas, caseína, albumina, entre outras (MECCA et al., 1979; AQUARONE et al., 1983; LLAGUNO e POLO, 1991).

A filtração separa as impurezas e os micro-organismos contidos no vinagre com a ajuda de um material filtrante, obtendo, assim, um vinagre límpido e brilhante. Os meios filtrantes utilizados são a filtração a cartucho, a filtração com extrato filtrante, a membrana filtrante, o filtro rotativo a vácuo e a filtração por meio de fibras vegetais

(LLAGUNO e POLO, 1991; AQUARONE et al., 2001). Dependendo do diâmetro das partículas a serem retidas, pode-se utilizar a ultrafiltração, que retém partículas com diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$  (LLAGUNO e POLO, 1991).

O envelhecimento irá submeter o vinagre a um período de maturação, fazendo com que o mesmo apresente sabor e aroma agradável (LLAGUNO e POLO, 1991).

A estabilização serve para manter as características físico-químicas e organolépticas durante a comercialização, sendo empregados métodos físicos ou químicos. Os métodos físicos mais utilizados são a pasteurização e a ultrafiltração (MECCA et al., 1979; LLAGUNO e POLO, 1991). A pasteurização trata o vinagre mediante a temperatura, destruindo as bactérias e inativando as enzimas que são predominantemente a causa mais importante das alterações (oxidação do ácido acético) do vinagre (MECCA et al., 1979; LLAGUNO e POLO, 1991; AQUARONE et al., 2001).

A pasteurização do vinagre pode ocorrer de duas formas. A rápida ou alta, em 75 a 80°C por 30 a 40 segundos, ou a baixa ou lenta, em 50 a 65°C por alguns minutos (20 a 30).

Os métodos químicos de estabilização consistem na adição de substâncias, como o dióxido de enxofre, dentro do limite permitido pela legislação brasileira, que consiste numa dose máxima de 0,02 g /100 mL.

## **2.7 Contaminação do vinagre**

Assim como outros alimentos, principalmente as bebidas fermentadas, o vinagre pode ser acometido por praga e causar infecções ou intoxicações. As contaminações que aparecem na fabricação do vinagre são de ordem microbiológica, microbiológica e química (LIMA et al., 1975; AQUARONE et al., 1983; SACHS, 2003).

### **2.7.1 Contaminação microbiológica**

Certas espécies de bactérias acéticas, a mais importante a *Acetobacter xylinum*, conhecida com o nome *A. aceti* subsp. *xylinus*, causam mucosidade e entupimento do equipamento, reduzindo a velocidade de acetificação no processo lento e,

consequentemente, a eficiência da fermentação devido à formação de um sedimento lodoso ou mesmo de uma película bacteriana muito grossa e viscosa (AQUARONE et al., 1983).

As próprias bactérias do gênero *Acetobacter* podem diminuir a acidez do vinagre através da oxidação do ácido acético. Quando as bactérias, por falta de etanol, decompõem rapidamente o ácido acético a anidrido carbônico (CO<sub>2</sub>) e água, reduzem a produção. Para o controle, o vinagre pronto na vinagreira deve ser retirado no máximo até 30 dias após a elaboração e armazenado em ambiente anaeróbio (AQUARONE et al., 1983).

Leveduras, bolores, algas e bactérias, sendo a mais conhecida a *Cândida vini* (*Mycoderma vini*), que forma as “flores do vinho”, causam uma película esbranquiçada, às vezes enrugada, que cresce na superfície dos substratos e de outros líquidos etanólicos. Provoca, também, alterações no vinagre, como sabor indesejável, danos no aroma e turvação do produto (SACHS, 2001).

As alterações de ordem microbiológica podem ser evitadas através do controle rigoroso das condições higiênicas, da limpeza do equipamento, do trabalho com alta concentração etanólica, acidez acética inicial adequada (de 2 a 3%), pasteurização, utilização de inóculo adequado e telas na vinagreira para impedir o surgimento de moscas (AQUARONE et al., 1983; CAMOCHENA e FERREIRA, 2006).

### 2.7.2 Contaminação microbiológica

Entre os principais contaminantes microbiológicos, merecem destaque a enguia, o ácaro e a mosquinha do vinagre.

Proveniente da má seleção dos frutos ou da poeira, a “enguia do vinagre” (*Anguillula aceti*), aumenta a viscosidade do produto, diminuindo suas características organolépticas (CAMOCHENA; FERREIRA, 2006). Os vinagres com 6% de ácido acético, numa temperatura de 20 à 30°C, são propícios a esta manifestação, as quais vivem bem por mais de 12 meses. Também, limita a atividade das bactérias acéticas, atacando a mãe do vinagre e atrasando o processo de acetificação, devido à imersão da película bacteriana no líquido a acetificar. Os vermes mortos em grande quantidade

causam cheiros desagradáveis devido à putrefação, apesar de não transmitir doenças ao homem (AQUARONE et al.,1983).

A contaminação pelo “ácaro do vinagre” ou “piolho do vinagre” contribui para uma acetificação lenta, produzindo vinagres de baixa acidez e turvo.

A *Drosophila melanogaster*, conhecida como “mosquinha do vinagre”, multiplica-se rapidamente em frutas podres, sucos e vinagres e pode ocasionar infectantes, principalmente o *A. xylinum*. Para evitar seu contato com o vinagre é preciso cobrir todos os orifícios do equipamento, bem como proteger as portas e janelas, e manter limpa as instalações (AQUARONE et al.,1983).

### 2.7.3 Contaminação química

Os metais são a principal fonte de alteração de ordem química. Concentrações muito elevadas de cobre resultam num sabor metálico e o escurecimento é provocando tanto pela sua maior concentração quanto pelo ferro, que atua sobre o tanino. A turvação é resultado do ferro agindo sobre fosfatos ou proteínas (CAMOCHENA e FERREIRA, 2006).

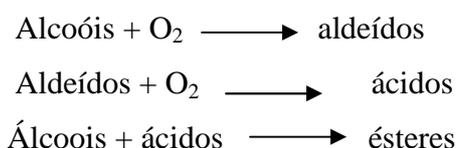
As medidas usadas para prevenir as contaminações de ordem química são evitar o contato de ligas metálicas (bronze, latão, aço, carbono, ferro galvanizado, alumínio, etc) no vinagre, sendo, por esta razão, utilizado tanques de aço inox, mais resistente ao ataque. Quanto à turvação, uma filtração é suficiente (SACHS, 2001).

## 2.8 Simulação do envelhecimento

Parâmetro de qualidade, o envelhecimento finaliza o processo bioquímico (SACCHETTI, 1972) e pode ser conduzido em material inerte como vidro, plástico e aço inox, conseguindo tirar o sabor picante de produto novo, melhorando sensivelmente as características sensoriais e nutricionais dos vinagres produzidos com frutas, cereais e mel, enquanto que os vinagres produzidos através da fermentação acética do etanol não sofrem modificações sensíveis durante o envelhecimento, por serem quase que somente uma

solução de ácido acético (PALMA, CARVALHO e GAVÓGLIO , 2001; TESFAYE et al., 2002).

Apesar de no Brasil o processo de envelhecimento não ser praticado (LLAGUNO e POLO, 1991), ele é importante pois, com passar do tempo, o produto se torna mais suave, com odor e sabor mais agradáveis devido às reações de esterificação e, que retiram grupos ácidos e etanóicos do meio, fornecendo ésteres aromáticos (ZANCANARO JR, 2001; BELLINI, 2006), bem como as reações de oxidação de grupos aldeídos, principalmente do acetaldeído, que conferem aspereza ao vinagre, resultando, então, no buquê, como acetato de etila, acetato de amila, etc, que continuam a serem formados mesmo após o engarrafamento (BELLINI, 2006; GARCIA PARRILLA et al., 1997; SACHS, 2001; ZANCANARO JR, 2001;).como pode ser observado nas reações abaixo:



Vinhos, vinagres e destilados submetidos à maturação em madeiras, originam produtos com propriedades sensoriais distintas, visto que são transferidos da madeira compostos aromáticos e polifenólicos (CHINNICI et al., 2007). Os polifenóis, encontrados em diferentes concentrações (DÁVALOS; BARTOLOMÉ; GÓMEZ-CORDOVÉS, 2005), apresentam atividade antirradical livre (REYNERTSON et al., 2006; KUSKOSKI et al., 2006), sendo responsáveis pela cor, adstringência e aroma de diversos alimentos (SOARES, 2002). Deve-se lembrar, contudo, que a composição química do vinagre está relacionada com a tecnologia e a matéria-prima que lhe deu origem (RIZZON; MIELE, 1998).

Segundo Mecca et al. (1979), durante o envelhecimento, a acidez fixa diminui e há formação dos taninos e corantes. A lignina presente na madeira se degrada, formando aldeídos fenólicos, resultando no sabor de produto envelhecido em madeira e com excelentes propriedades organolépticas (GARCIA PARRILLA et al., 1997).

O envelhecimento, em recipientes de madeira, deve ser realizado na ausência de ar, evitando a oxidação do ácido acético. Contudo, Alves e Bellini (UNICAMP, 2006) citam que a legislação prevê, para o vinagre, a substituição futura das dornas de madeira

pelas de aço inox, por questões de saúde pública. Isto tem levado a estudos de fermentação em aparas de madeira, de onde vem sendo observado que o vinagre incorpora quantidade significativa de polifenóis e se mostra eficiente como antioxidante e como sequestrante de radicais livres, além de enfatizar a viabilidade tecnológica nobre e de fácil execução.

O tempo esperado para o envelhecimento é de alguns meses, podendo chegar a um ano. Os vinagres de etanol, contudo, podem levar algumas semanas apenas (AQUARONE et al., 1983).

## **2.9 Análise sensorial**

Segundo Watts et al. (1992), a análise sensorial é uma ciência que interage os órgãos dos sentidos para os avaliadores medirem a aceitabilidade dos produtos. Muñoz et al. (1992) citam que esta análise garante a qualidade nas indústrias de alimentos e bebidas, verificando diferenças perceptíveis e identificando as características mais importantes de um produto ao detectar particularidades e avaliar a aceitação de produtos.

O fator determinante para a aceitação de um alimento pelo consumidor é a aparência, ou seja, a coloração, a forma e a embalagem, bem como o aroma, o sabor e a textura. A análise sensorial trabalha de forma sincronizada com estes atributos sensoriais, a partir dos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição, buscando atender às necessidades dos consumidores e dos produtores (PEDRÃO e CORÓ, 1999).

O consumidor atual tem desenvolvido uma grande exigência na hora de escolher o produto que mais lhe agrada. Plating (1988) descreve a sensação do gosto e indica estruturas anatômicas situadas na língua do indivíduo, que são responsáveis pela percepção de gostos. Cita, também, que existem quatro qualidades para gosto, que são o doce, o salgado, o ácido e o amargo, cujas sensações são codificadas por células específicas, localizadas na língua do provador, chamadas papilas. Além das papilas, existe todo um sistema de nervos que são responsáveis pelo transporte dessas sensações até o cérebro. Assim, a partir do conhecimento da fisiologia da língua, é possível saber em qual região os gostos serão detectados, a partir de testes que podem dimensionar a intensidade, extensão, duração, qualidade, gosto ou desgosto em relação ao produto avaliado.

A avaliação sensorial tem muitas finalidades, dentre elas o desenvolvimento de novos produtos, reformulação dos produtos já existentes no mercado, estudo da vida de prateleira (*shelf life*), avaliação das diferenças e similaridades apresentadas entre produtos concorrentes, identificação da preferência dos consumidores por um determinado produto e, também, otimização e melhoria da qualidade (SGS, 2011).

Segundo Amarine et al (1976), a análise sensorial também pode ser utilizada para avaliar os constituintes desejáveis ou indesejáveis, propor tratamentos, determinar a vida útil do vinho e/ou vinagre, pois a análise química complementa os dados sensoriais, embora substrato etanólico e/ou vinagres com a mesma análise química possam ter sabores e odores bastante diferentes.

O objetivo da avaliação sensorial é detectar diferenças entre os produtos baseado na percepção da intensidade de alguns atributos (FERREIRA et al., 2000). Contudo, conforme o produto, o atributo sensorial e a finalidade do estudo, existem recomendações de métodos, referindo a NBR 12994, que classifica os métodos de análise sensorial dos alimentos e bebidas em discriminativos, descritivos e subjetivos (ABNT, 1993).

Os testes subjetivos ou afetivos são usados para avaliar a preferência e/ou aceitação de produtos. Tem como desvantagem, um grande número de julgadores requerido para essas avaliações, e a vantagem de os julgadores não serem treinados, mas representarem uma população alvo (IFT, 1981). Assim, tornam-se uma importante ferramenta, pois acessam diretamente a opinião do consumidor já estabelecido ou potencial de um produto, sobre características específicas do produto ou idéias sobre o mesmo, senso, por isso, também chamados de testes de consumidor (FERREIRA et al., 2000).

As principais aplicações dos testes afetivos são a manutenção da qualidade do produto, otimização de produtos e/ou processos e desenvolvimento de novos produtos. A escala hedônica é usada para medir o nível de preferência desses produtos por uma população, que relata os estados agradáveis e desagradáveis no organismo. Também mede o gostar ou desgostar de um alimento. Na avaliação da escala hedônica, os resultados são analisados estatisticamente para determinar a diferença no grau de preferência entre amostras (IFT, 1981; LAND e SHEPHERD, 1988; ABNT, 1998).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

O projeto visou o aproveitamento de excedentes da safra de laranja lima na região do Vale do Mundaú, diversificando a produção a partir da elaboração de vinagres. Para tal, foram desenvolvidas técnicas simples e de fácil aplicação em meio rural, verificando a acidez, o rendimento, a cor e as características organolépticas obtidas a partir das diferentes técnicas abordadas.

#### **3.2 Específicos**

- ✦ Crescimento, isolamento e caracterização dos micro-organismos nas 2 etapas de fermentação;
- ✦ Obtenção e caracterização físico-química da polpa de laranja lima;
- ✦ Fermentação etanóica;
- ✦ Fermentação acética a partir de diferentes técnicas;
- ✦ Simulação do envelhecimento do vinagre, sob a influência do tipo de madeira e da presença ou não de luz;
- ✦ Análises físico-químicas e sensoriais.

## 4 METODOLOGIA

Todo o trabalho foi executado nos Laboratórios de Ensino em Engenharia Química (LEEQ) e de Tecnologia de Bebidas e Alimentos (LTBA) do Centro de Tecnologia (CTEC) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). As estratégias analíticas são detalhadas a seguir:

### 4.1 Crescimento, isolamento e caracterização dos micro-organismos nas etapas de fermentação

Nos primeiros estudos de fermentação etanóica, utilizou-se uma linhagem de levedura *Sacchromyces cerevisiae*, selvagem, isolada e pura, codificada como RL 11 e gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (SCHWAN et al., 2003). Esta levedura possui como diferencial a melhoria das propriedades sensoriais da bebida. Para facilitar a produção do fermentado etanóico e do vinagre de laranja lima por pequenos produtores, novos estudos foram desenvolvidos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial, na forma de fermento biológico seco instantâneo.

Para o isolamento da bactéria acética do vinagre, iniciou-se o processo de acetificação do substrato de laranja lima com vinagre forte não pasteurizado, conhecido também como acetato pós-cabeça da produção de vinagre, gentilmente cedido pela indústria Maratá, localizada no município de Lagarto-SE, que permitiu a formação da mãe do vinagre.

Todas as culturas foram isoladas e conservadas à 4°C, em tubos inclinados contendo meio rico, YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar).

Para caracterização microbiológica, as culturas foram visualizadas em microscópio óptico. A amostra de bactéria também foi identificada pelo teste de coloração de Gram e de catalase, o qual permite identificar o metabolismo do micro-organismo.

Para a análise de Gram, foi realizado um esfregaço da cultura em lâmina, sendo em seguida fixado com calor. Aplicou-se, sequencialmente e em tempo padronizado, a solução cristal violeta (corante primário), o lugol (fixador), a solução etanol-cetona 1:1

(descolorizador) e, por fim, a solução de safranina (corante secundário). Após secagem, a lâmina foi examinada em microscópio óptico sob objetiva de imersão 100. As bactérias coradas de rosa são Gram negativas, enquanto que as de cor violeta são denominadas de Gram positivas.

O teste de catalase foi realizado utilizando-se o peróxido de hidrogênio, que auxilia a verificar o metabolismo oxidativo da bactéria através da liberação de bolhas quando o reagente entra em contato com a suspensão de células.

#### **4.2 Obtenção e caracterização físico-química da polpa de laranja lima**

Os frutos de laranja lima foram cedidos pela COOPLAL (Cooperativa dos Produtores de Laranja Lima de Santana do Mundaú), parceiro do projeto do Arranjo Produtivo Local (APL) da Laranja Lima, juntamente com o SEBRAE-AL.

Após a recepção dos frutos, realizou-se uma seleção primária, descartando os frutos estragados. Em seguida, as laranjas foram lavadas e sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 100 ppm por 15 minutos, como ilustrado na Figura 6, condição recomendada para desinfecção de legumes, verduras e frutas.

**Figura 6** – Laranjas limas imersas em solução de hipoclorito de sódio.



Fonte: Acervo do laboratório.

Posteriormente, as frutas foram enxaguadas em água destilada, secas ao ar livre e acondicionadas em geladeira até o momento do processamento.

Com a finalidade de se avaliar o rendimento da laranja lima, averiguou-se o peso total do fruto, da casca e do bagaço de laranja lima processados, bem como o teor de suco, transferindo-o para proveta.

Os frutos foram processados em extrator de sucos Extrasuk, e o produto foi armazenado em embalagens plásticas e acondicionado em freezer (-18°C) até a sua utilização. Vale salientar que, para estabilidade e conservação do suco em função de sua baixa acidez, foram adicionados 3,3% de suco de limão à polpa de laranja lima extraída (VILELA et al., 2010).

As análises físico-químicas realizadas na polpa de laranja lima foram pH, acidez total, sólidos solúveis (°Brix), resíduo mineral fixo, açúcares, proteínas, lipídios e umidade, seguindo a metodologias do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). O teor de vitamina C foi determinado de acordo com a metodologia proposta pela Association Official Analysis of Chemistry (AOAC, 1984). As análises de açúcar redutor total (ART) foram realizadas pelo método de DNS.

#### 4.2.1 Determinação do pH

A amostra foi transferida para um becker em quantidade suficiente para cobrir o eletrodo do pHmetro TECNAL TEC-5, sendo, então, determinado o pH através da leitura direta do equipamento previamente calibrado em soluções padrão de pH 4,0 e 7,0.

#### 4.2.2 Determinação da acidez

O método se baseia na titulação de neutralização de ácidos com solução padronizada de NaOH 0,1 N e com o uso de indicador fenolftaleína. É expressa em g de ácido acético por cento, considerando o ácido predominante na amostra. Foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL um volume conhecido da amostra, 30 mL de água destilada e 2 a 3 gotas de fenolftaleína. Titulou-se esta mistura com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até coloração rósea persistente.

A acidez da amostra foi obtida pela Equação 1:

$$\text{acidez (g ácido/100g)} = \frac{n \cdot N \cdot f \cdot PM_{\text{ácido}}}{10 \cdot V \cdot nh} \quad (1)$$

onde:

n = volume gasto na titulação da solução de NaOH, em mL

N = normalidade da solução de NaOH

f = fator de correção da solução de NaOH

V = volume de amostra (g)

nh = número de hidrogênios ionizáveis

PM = peso molecular do ácido

Para o ácido cítrico, a quantidade de hidrogênios ionizáveis (nh) é 3 e o peso molecular é 192. Para o ácido acético, tem-se apenas 1 hidrogênio ionizável e seu peso molecular é 60.

#### 4.2.3 Determinação de sólidos solúveis

Esta determinação foi realizada a partir de leitura direta em refratômetro digital R2-mini. Para isto, o aparelho foi calibrado com água destilada e, após seco, colocavam-se 2 a 3 gotas da amostra, realizando-se sua determinação.

#### 4.2.4 Determinação de resíduo mineral fixo

Resíduo mineral por incineração ou cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a 550°C. Para a sua determinação, foram pesados em balança analítica 3 mL da amostra em um cadinho previamente aquecido em mufla EDG mod 3000-3P-CE-INOX a 550°C por 60 min e resfriado em dessecador até a temperatura ambiente por no mínimo 30 min. Em seguida, a amostra foi evaporada em chapa quente até completa carbonização e incinerado em mufla a 550°C por cerca de 6 horas, devendo as cinzas ficar brancas ou ligeiramente acinzentadas. O

cadinho com o material foi, então, resfriado em dessecador por no mínimo 30 min até a temperatura ambiente e pesado. A Equação 2 mostra o cálculo para o teor de cinzas.

$$\text{cinzas (g/100g)} = \frac{100.N}{P} \quad (2)$$

onde:

N = massa de cinzas (massa final da amostra menos a tara do cadinho) (g)

P = massa tomada da amostra (g)

#### 4.2.5 Determinação de proteína total

O nitrogênio presente nos alimentos pode ser protéico, como também proceder de sais de amônia, de bases nitrogenadas, etc. A análise de proteínas pelo método de Kjeldahl, determina o nitrogênio total da amostra, que através de cálculo é transformado em nitrogênio protéico (proteína na amostra). Para tanto, considera-se que cada 100 g de proteína contêm, em média, 16 g de nitrogênio, obtendo-se, desse modo, o fator 6,25 (100/16), que multiplicado pelo percentual de nitrogênio total da amostra dará o percentual da fração protéica na mesma.

Foram transferidos 0,5 g de amostra para um tubo de Kjeldahl e adicionados 2 g de mistura catalítica (sulfato de sódio, sulfato de cobre e dióxido de selênio na proporção 100:1:0,8). Na capela de exaustão de gases, adicionou-se ao tubo cerca de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, tendo-se o cuidado de fazer com que a amostra e os reagentes caíssem no fundo do tubo, sem tocar as paredes. Acoplou-se o tubo ao digestor Tecnal TE-040/25, ajustando o aquecedor inicialmente numa posição de aquecimento baixo, para evitar a digestão violenta e conseqüente perda do material. A cada 15 min, elevou-se a temperatura suavemente (mais 50°C) até que a mesma chegasse a 350°C. O tempo de digestão finalizou-se quando a amostra digerida apresentou coloração incolor ou levemente esverdeada. Após esta etapa, desligou-se o aquecedor e deixou-se 15 a 30 min em repouso para esfriar, colocando na boca do tubo um tampão de algodão.

Para o processo de destilação, 25 mL de ácido bórico a 4% foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL, adicionando-se 2 gotas de indicador vermelho de metila 0,25 e 2 gotas de indicador verde de bromocresol 0,2%. Preparou-se o destilador de Kjeldahl Tecnal TE-0363, mergulhando a saída do condensador no Erlenmeyer, tendo o cuidado de observar se a extremidade final deste estava completamente mergulhada na solução de ácido bórico. Adicionou ao tubo contendo a amostra digerida água destilada até um pouco menos da metade do tubo e 3 a 5 gotas de fenolftaleína 1%. Acoplou-se o tubo ao destilador de Buchi. Após a solução estar aquecida, desligou-se o aquecimento e adicionou-se, lentamente, NaOH 40% até se conseguir-se pH alcalino (mudança para coloração rosa). Em seguida, iniciou-se a destilação até recolher um volume de destilado no Erlenmeyer de aproximadamente 100 mL.

Por fim, a solução do Erlenmeyer foi titulada com ácido clorídrico 0,1 N padronizado, até o aparecimento da coloração alaranjada. O cálculo da concentração de proteínas pela análise de nitrogênio total é apresentado na Equação 3:

$$\text{Proteína total (g/100 g)} = \frac{V_{\text{HCl}} \cdot f_{\text{HCl}} \cdot N_{\text{HCl}} \cdot F \cdot 1,4}{P} \quad (3)$$

onde:

V = volume gasto na titulação com ácido clorídrico 0,1 N

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N

F = fator de correspondência nitrogênio-proteína para alimentos 6,25

P = massa tomada de amostra (g)

#### 4.2.6 Determinação de lipídios

Colocou-se em estufa a 105°C, por no mínimo 1 hora, o copo de extração previamente identificado. Em seguida, o mesmo foi transferido para um dessecador, por cerca de 15 min, e pesado em balança analítica. Pesou-se 2 a 5 g de amostra em cartucho feito com papel de filtro qualitativo, levando-se a amostra líquida para secagem em estufa e, em seguida, fechando-a com algodão. Acoplou-se o cartucho em analisador de gorduras SOLAB SL 202/8, adicionando ao copo de extração, previamente seco e pesado,

100 mL de hexano e procedendo à extração contínua por 2 horas a 100°C, sendo o tempo de extração determinado pela limpidez do solvente destilado. Desmontou-se o sistema de Soxhlet, retirou-se o papel de filtro, e buscou-se recuperar o máximo de hexano com o sistema a 135°C. Em seguida, levou-se o copo de extração contendo o óleo à estufa a 105°C, mantendo-o por cerca de 2 horas. Esfriou-o em dessecador por cerca de 15 min e o pesou. O cálculo do teor de lipídios é apresentado na Equação 4.

$$\text{lipídios (g/100g)} = \frac{100.N}{P} \quad (4)$$

onde:

N = massa de lipídios (massa final do balão menos a tara do balão) (g)

P = massa tomada da amostra (g)

#### 4.2.7 Açúcares redutores totais

A hidrólise de açúcares redutores totais foi realizada transferindo-se 2 mL de amostra e adicionando a ela 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5M. O tubo foi levado a banho fervente por 30 min, com agitação ocasional para hidrolisar os polissacarídeos e outros açúcares não-redutores (ao menos a cada 5 min). Após este tempo, foi resfriado em banho de gelo, adicionado 2 gotas de fenolftaleína e neutralizado, cuidadosamente, com NaOH 10%. Ao atingir a neutralidade (coloração rosa), foi adicionada 1 gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5M, voltando a solução à coloração original, homogenizando-se a amostra, filtrando-a em papel filtro e completando o volume com água destilada até 25 mL.

A determinação foi feita transferindo-se 0,25 mL da amostra para um tubo de ensaio com tampa rosqueada, adicionando 0,5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de DNS. A amostra foi levada para banho fervente por 5min, permitindo que ocorresse a reação entre a glicose e o DNS. O tubo foi resfriado em banho de gelo e o volume ajustado com água destilada para 5 mL, ou seja, adicionando 4 mL de água. A amostra foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm, tendo como padrão concentrações conhecidas de glicose. A partir da curva padrão de concentrações conhecidas de glicose obteve-se a equação da reta que permitiu calcular a concentração de glicose em cada amostra. Para “zerar” o espectrofotômetro e ler as absorvâncias, fez-

se necessário um branco, substituindo-se na reação de DNS a amostra por água destilada. A Equação 5 determina o cálculo do ART, com o auxílio da Equação 6.

$$\text{ART (g/100g)} = \frac{100 \cdot \text{Absorvância} \cdot \text{fator da curva padrão}}{\text{concentração (g/L)}} \quad (5)$$

$$\text{concentração (g/L)} = \frac{\text{massa de amostra (g)} \cdot \frac{1000(\text{mL})}{1(\text{L})}}{\text{volume da proveta(mL)}} \quad (6)$$

#### 4.2.8 Determinação da umidade

Todos os alimentos, qualquer que seja o modo de industrialização a que tenham sido submetidos, contêm água em maior ou menor proporção. A umidade, então, corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida, bem como outras substâncias que se volatilizam nessas condições.

O método se baseia na pesagem de uma quantidade de amostra em cápsula metálica, previamente tarada, sendo levada à estufa a 105°C até peso constante. Para isto, a amostra é retirada da estufa e colocada em dessecador, por no mínimo 15 min, sendo posteriormente pesada. A determinação do teor de umidade é dada pela Equação 7.

$$\text{umidade (g/100g)} = \frac{100 \cdot N}{P} \quad (7)$$

onde:

N = massa seca (massa final da amostra menos a tara da cápsula) (g)

P = massa tomada da amostra (g)

#### 4.2.9 Determinação de vitamina C

O método de análise empregado no estudo faz uso de solução padrão de ácido ascórbico, solução de DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol) e solução de extração, conforme metodologia da Association of Official Analysis Chemistry (AOAC, 1984).

A solução de extração foi feita dissolvendo-se 12,5 g de ácido oxálico em 40 mL de ácido acético glacial e 200 mL de água destilada, completando-se o volume com água destilada para 500 mL. Esta solução deve ser armazenada em refrigerador até o início das análises e pode ser utilizada por um período de 7 dias.

A solução de titulação, o 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), deve ser preparada adicionando-se 50 mg de sal sódio 2,6-diclorofenolindofenol em 50 mL de água destilada contendo 42 mg de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e armazenada protegida da luz.

A solução padrão de ácido ascórbico foi preparada pesando-se 70 mg (0,07 g) de ácido ascórbico e dissolvendo-o em solução de extração em balão volumétrico de 50 mL. O balão deve ser recoberto com papel de alumínio e a solução preparada imediatamente antes do uso. Para a sua padronização, transferiram-se 2 mL de solução padrão de ácido ascórbico para Erlenmeyer de 125 mL, contendo 5 mL da solução de extração, titulando esta mistura com DCPIP até que uma cor rosa claro persistisse por um tempo igual ou superior a 5 segundos.

A determinação de vitamina C em amostras foi realizada pesando-se uma massa de amostra e diluindo-a em solução de extração. Em seguida, foram transferidos 7 mL da amostra para frasco Erlenmeyer de 250 mL, titulando-se rapidamente com solução 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) até viragem para a coloração rosa. O cálculo da concentração de vitamina C foi obtido a partir das Equações 8 e 9.

$$\text{Fator} = \frac{\frac{\text{massa}_{\text{ácido ascórbico}}}{\text{volume do balão}} \cdot 2}{\text{volume de DCPIP gasto}} \quad (8)$$

$$\text{vitamina C (mg/100 mL)} = \frac{100 \cdot \text{Fator} \cdot V_{\text{balão}}}{7 \cdot V_{\text{DCPIP}} \cdot V_{\text{amostra}}} \quad (9)$$

onde:

$massa_{\text{ácido ascórbico}} = \text{massa de ácido ascórbico (g) usada na padronização}$

$V_{\text{DCPIP}} = \text{volume de DCPIP gasto na titulação}$

$V_{\text{balão}} = \text{volume do balão para o preparo da amostra}$

$V_{\text{amostra}} = \text{volume de amostra para o preparo da análise (mL)}$

#### 4.2.10 Determinação do teor de carboidratos e valor energético

A composição química de um alimento é composta por água, proteínas, lipídeos, carboidratos e cinzas. O teor de carboidratos foi obtido pela diferença entre os outros constituintes, por meio da Equação 10 (CREPALDI et al., 2006).

$$\text{carboidratos}(g/100g) = 100 - [\text{umidade} + \text{cinzas} + \text{lipídios} + \text{proteína}] \quad (10)$$

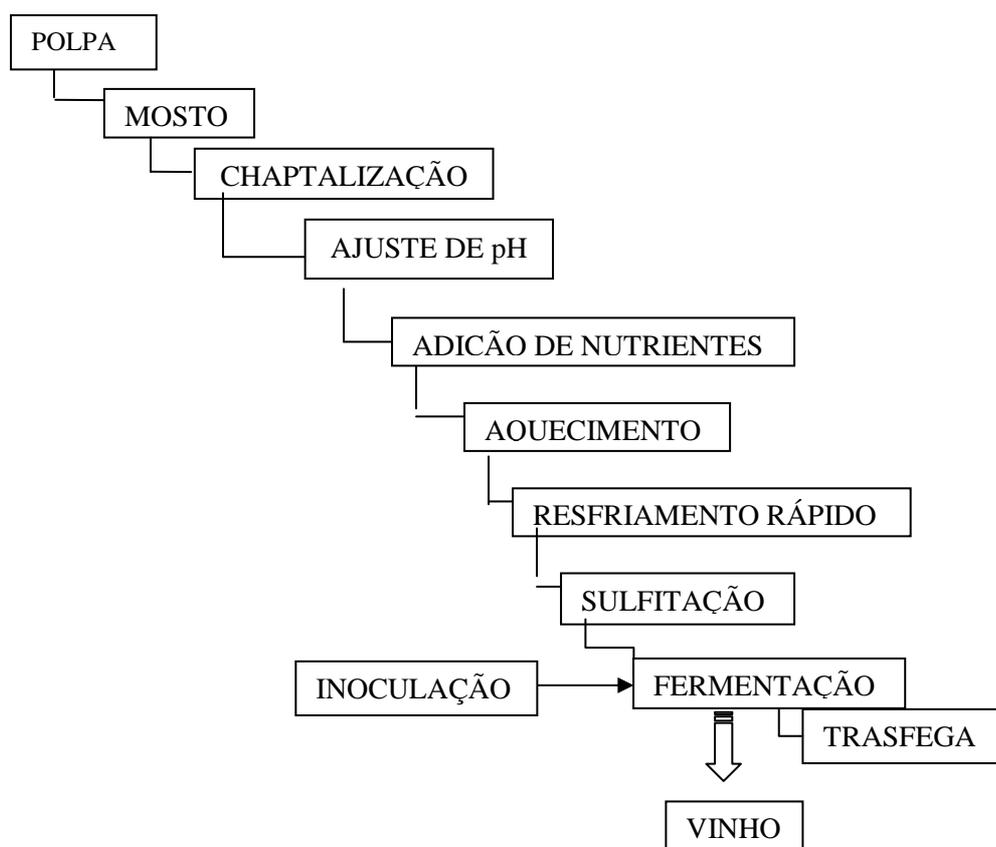
O valor calórico foi calculado a partir da Equação 11 (JOHANNESSEN, 1967; KOZIOL; PEDERSEN, 1993).

$$\text{valor calórico}(kcal/100g) = 4.[\text{carboidratos} + \text{proteína}] + 9.[\text{lipídios}] \quad (11)$$

### 4.3 Fermentação etanólica

O suco de laranja lima foi utilizado como mosto e merece determinados cuidados para que se obtenha um substrato de boa qualidade. Para a elaboração do mosto, a polpa foi descongelada à temperatura ambiente e homogeneizada. O processo fermentativo foi desenvolvido utilizando 1/3 (v/v) de polpa para cada litro de água. Um fluxograma mostrando as etapas do processo fermentativo é ilustrado na Figura 7.

Nos primeiros estudos, a fermentação etanólica foi conduzida utilizando o fluxograma abaixo, com toda tecnologia oferecida pelo laboratório, ou seja, equipamentos e materiais que permitiam adequado controle.

**Figura 7** - Fluxograma do processo de fermentação etanólica.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

A chaptalização foi realizada adicionando açúcar (sacarose) ao mosto, aumentando o teor de sólidos solúveis na condição desejada para estudo, o qual ficou entre 17 e 28 °Brix. As diferentes concentrações de °Brix, mesmo trabalhando com concentrações elevadas, teve como interesse buscar a melhor forma de condução da fermentação etanólica.

Após a chaptalização, ajustou-se o pH do mosto para 4,5 com solução de carbonato de sódio 10%, pois, segundo Lopes et al. (2005), uma boa fermentação é conduzida com pH na faixa de 4,5 a 5, visto que as leveduras desenvolvem-se melhor em meios ácidos.

A adição de nutrientes foi necessária para o desenvolvimento dos microorganismos, melhorando o comportamento da fermentação e suplementando as necessidades de magnésio, fósforo e nitrogênio na fermentação. Assim, foram

adicionados ao mosto, sulfato de magnésio (0,1g/L), fosfato de potássio (0,5 g/L) e sulfato de amônio (0,5 g/L), como nutrientes após o ajuste de pH.

Posteriormente, procedeu-se o aquecimento do mosto, em chapa quente à 65 °C por 30 minutos. Em seguida, o mosto foi resfriado em banho de gelo até atingir temperatura ambiente, transferido para recipientes estéreis e, posteriormente, realizou-se a esterilização, adicionado 0,1g/L de metabissulfito de sódio.

A adição de metabissulfito de sódio é importante porque previne o desenvolvimento de leveduras selvagens e bactérias, como também oxidações indesejáveis, assegurando a assepsia do mosto, sem afetar a atividade da levedura que será inoculada (GARRUTI et al., 2003).

A inoculação foi realizada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* comercial e uma linhagem selvagem, isolada e pura de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, codificada como RL 11, a partir de contagem de células em câmara de Neubauer, padronizando-se, para cada etapa de fermentação, concentração inicial de células de 0,02 g/L ou  $10^7$  células/mL

A seleção da levedura adequada para cada tipo de fermentação é uma estratégia importante para garantir uma fermentação completa, além de também melhorar as características finais do fermentado etanólico. Por isto, foram utilizadas como inóculo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial, na forma de fermento biológico seco instantâneo e uma linhagem selvagem, isolada e pura da levedura *Sacchromyces cerevisiae*, codificada como RL 11.

Os mostos foram mantidos em estufa bacteriológica SL 101, visando impedir a entrada de luz e de O<sub>2</sub> nos frascos Erlenmeyer.

Para trazer à realidade do meio rural, facilitando o trabalho dos produtores locais, um segundo estudo de produção etanólica foi realizado, onde as etapas de adição de nutrientes foi eliminado do processo e a inoculação das leveduras, que garante a fermentação dos açúcares existentes no mosto, foi realizada com 1 g/L de fermento biológico seco instantâneo. O mosto resfriado foi transferido para garrações plásticos previamente higienizados. A garrafa plástica foi conectada, por meio de uma mangueira, a outra garrafa contendo água, a fim de verificar a liberação de CO<sub>2</sub>, no andamento da

fermentação. Esse segundo estudo de fermentação etanóica foi conduzido com forma de produção artesanal.

A fermentação foi acompanhada pela medida diária de sólidos solúveis totais, por refratometria, sendo a fermentação finalizada quando a leitura do °Brix ficasse constante, bem como pelo teor etanóico, realizado em ebuliômetro, pH através da leitura direta em pHmetro e acidez total, por titulometria com NaOH 0,1N. O final da fermentação, ao utilizar a forma artesanal de produção, também pode ser percebido quando se encerra a liberação de CO<sub>2</sub> no frasco conectado a mangueira contendo água.

Uma vez concluída a fermentação, as leveduras e outros organismos (principalmente bactérias), resíduos sólidos, matérias orgânicas, etc vão sendo depositados no fundo do recipiente. Deste modo, origina-se um depósito de composição heterogênea, que não é conveniente ficar em contato com o substrato, já que poderia transmitir-lhe sabores indesejáveis em curto período de tempo, como consequência de putrefação das leveduras não-viáveis, desprendimentos de odores das matérias orgânicas, etc. Impõe-se, então, a realização de uma trasfega ou mudança do substrato de um recipiente a outro, com a finalidade de separá-lo desses sedimentos (MADRID et al., 1996).

O substrato de laranja lima obtido após a primeira trasfega entra no processo de maturação. Alguns dias depois, nova trasfega deve ser realizada, sendo, em seguida, filtrado em papel de filtro para a retirada de resíduos ainda existentes, como mostra a Figura 8.

**Figura 8** – Processo de filtração do vinho.



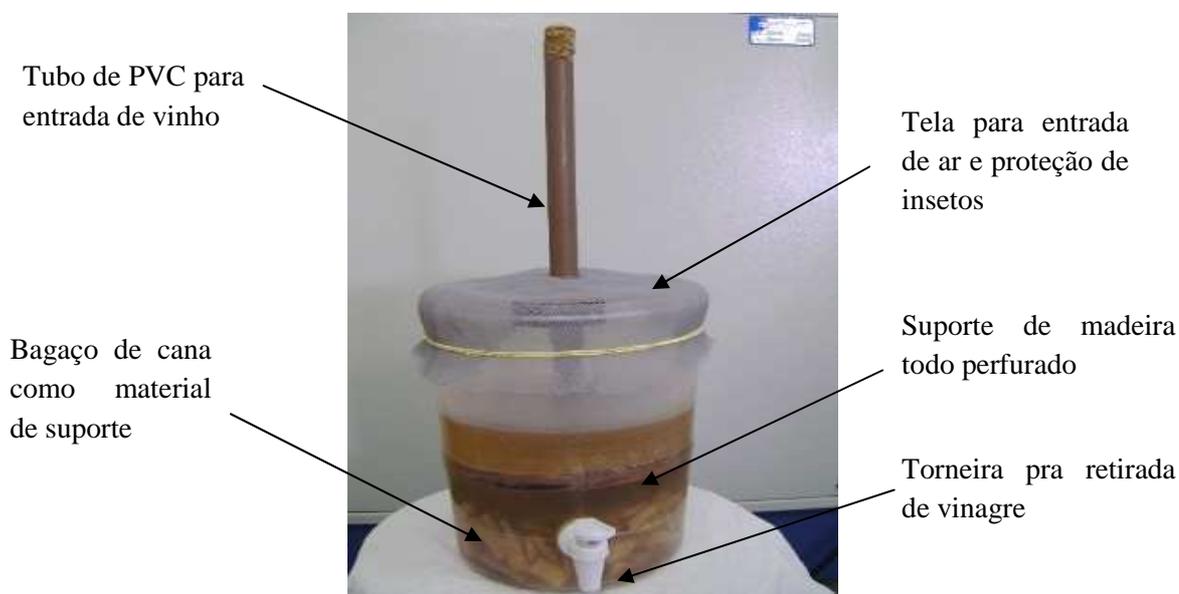
Fonte: Autora desta dissertação, 2012

#### 4.4 Fermentação acética

A matéria-prima utilizada para produção de vinagre de laranja lima foi o fermentado de laranja. As bactérias ácido-acéticas foram provenientes de um vinagre forte não pasteurizado, fornecido pela indústria de vinagre Maratá, localizada no município de Lagarto, no Estado de Sergipe.

A fermentação acética foi conduzida em duas vinagreiras. A primeira vinagreira, desenvolvida de acordo com a Figura 9, imitou o processo Orleans, sendo denominada de vinagreira I. Construída em recipiente plástico, contendo em seu fundo pedaços de bagaço de cana-de-açúcar como material de enchimento, previamente tratado na razão de etanol:água 1:9. O bagaço de cana-de-açúcar irá servir como suporte para imobilização e conseqüentemente, crescimento e desenvolvimento mais acelerado das bactérias acéticas, permitindo maior reprodutibilidade ao processo, além de ser um material de baixo custo e de fácil acesso.

**Figura 9** - Detalhamento da vinagreira I.



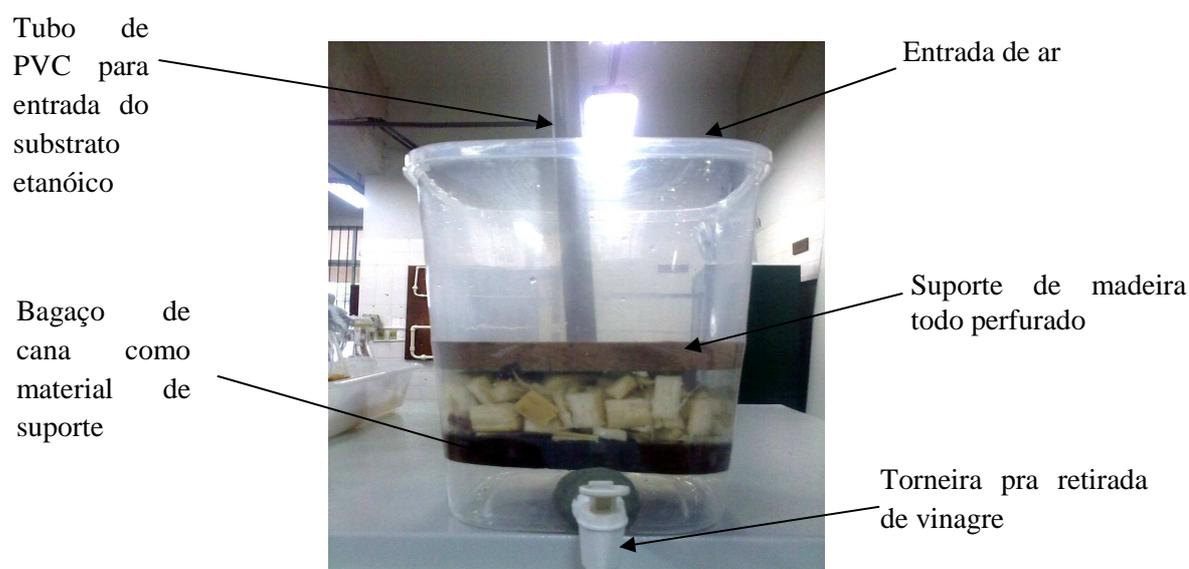
Fonte: Autora desta dissertação, 2012

Na superfície do mosto possui um suporte de madeira no formato de uma circunferência, todo perfurado, servindo de sustentação durante a formação da película gelatinosa, ou seja, a “mãe do vinagre”. As perfurações do suporte de madeira servem para diminuir a velocidade de escoamento do substrato etanólico sobre o material de enchimento, favorecendo uma maior distribuição do líquido sobre o bagaço de cana. Também possuiu uma tela na superfície, para proteção de insetos e favorecimento à entrada de ar.

Por fim, um tubo de PVC, em forma de “J”, que vai desde o início da vinagreira até o suporte de madeira perfurado, permitindo que o substrato etanólico recirculado escorra sobre o suporte de madeira e seja gotejado no material de enchimento, com uma menor velocidade de escoamento. O vinagre foi retirado por uma torneira localizado na parte inferior da vinagreira.

A segunda vinagreira, designada vinagreira II e ilustrada na Figura 10, buscou simular o processo Alemão, com algumas adaptações, fazendo uso de três compartimentos, sendo o superior para sustentação da mãe do vinagre, o central, contendo pedaços de bagaço de cana como material de enchimento e a inferior, para recirculação do substrato etanólico e retirada do vinagre, porém isento de sistema de aeração e recirculação automatizado.

**Figura 10** – Detalhamento da vinagreira II.



Ambas as vinagreiras foram construídas sem muitos recursos, de forma simples, a fim de proporcionar melhor acesso aos produtores rurais.

Foram realizados dois estudos de produção de vinagre. No primeiro estudo, com a vinagreira I, adicionou-se 1600 mL de substrato etanólico de laranja lima. A cultura acética, composta de 10% do volume total do substrato, ou seja, 160 mL, foi o vinagre forte não pasteurizado fornecido pela indústria Maratá, denominado de acetato pós-cabeça.

Após o primeiro estudo na vinagreira I, foi realizado um segundo estudo utilizando as vinagreiras I e II, como mostra a Figura 11, diferenciando a concentração de vinagre forte não pasteurizado utilizada nas vinagreiras. Na vinagreira I foi adicionando 1050 mL do substrato etanólico de laranja lima, diminuindo a quantidade da cultura acética para 7,14 % do volume total do substrato, ou seja, 75 mL. Na vinagreira II foram acrescentados 2600 mL de substrato de laranja lima e 10% de vinagre forte não pasteurizado, ou seja, 260 mL.

**Figura 11** - Vinagreiras I e II em processo de fermentação.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012

É importante o acompanhamento da fermentação acética para verificação do consumo de etanol e formação de ácido acético na vinagreira. Quando a quantidade de etanol cai e a acidez do vinagre não está dentro dos padrões aceitos pela legislação (4%), a vinagreira deve ser alimentada com mais substrato etanólico.

Ao adicionar substrato etanólico de laranja lima à vinagreira, há a diluição da concentração de ácido acético formado, ocasionando uma pequena queda na acidez. No entanto, dependendo do volume contido na vinagreira e do volume de substrato adicionado, pode ocorrer um aumento na quantidade de etanol. Dessa forma, as bactérias acéticas transformam o etanol em ácido acético, recuperando e elevando a acidez até os parâmetros permitidos pela legislação.

#### 4.4.1 Filtração e pasteurização

A filtração foi realizada utilizando papel filtro qualitativo e, em seguida, a garrafa contendo a amostra foi levada a banho-maria em chapa de aquecimento, esterilizando a 65 °C por 5 min, tempo esse que, segundo Aquarone et al. (1990), é suficiente para um vinagre produzido sob processo lento.

#### 4.4.2 Técnicas de envelhecimento

Poucos estudos são realizados acerca do envelhecimento do vinagre. Tradicionalmente, o envelhecimento do vinagre é feito em barris de carvalho. Neste estudo, todos os vinagres foram simulados ao envelhecimento utilizando pedaços de madeira em embalagens de politeraftalato de etileno (PET) e sob duas condições diferentes, presença e ausência de luz, esta última envolvendo a garrafa em papel de alumínio.

Segundo Aquarone et al. (2001), o vinagre deve ser armazenado em material que não sofra corrosão, resistente e sem transmissão de cor e cheiro ao produto, normalmente se utilizando de garrafas de vidro ou PVC, lacradas com tampas plásticas

As embalagens PET são produzidas por processo de sopro-biorientado, o qual permite aumentar a tenacidade do material, promovendo maior resistência à ruptura e

menor permeabilidade ao CO<sub>2</sub>, aumentando o tempo de vida útil da bebida (CASTRO, 2002).

Madeiras de eucalipto, pino, pinho, canela, e rolhas de cortiça, foram estudadas, sendo previamente lavadas em água morna e secas em estufa a 100°C por no mínimo 1 hora. O uso da madeira visa a melhoria das propriedades sensoriais e organolépticas do vinagre, uma vez que, em contato com a madeira, o produto aumenta a sua concentração de polifenóis, os quais tornam o vinagre melhor (CANAS et al.,2002).

Os vinagres obtidos nos primeiros estudos com a vinagreira I foram simulados ao envelhecimento com pedaços de madeira de eucalipto, pino e pedaços de rolhas de cortiça. Os vinagres obtidos no segundo estudo com a vinagreira I foram simulados ao envelhecimento com pedaços de madeira de pinho e canela. Os vinagres obtidos com a vinagreira II não foram simulados ao envelhecidos.

Paralelamente aos envelhecimentos em pedaços de madeira, outro vinagre foi envasado, sem nenhum material para simulação de envelhecimento, definido como branco, para poder avaliar se a simulação de envelhecimento do vinagre realmente é eficaz na melhoria da qualidade sensorial e organoléptica.

O tempo utilizado para o envelhecimento varia, classificando o produto em relação ao tempo de envelhecimento (SOUZA, 2006), podendo levar de semanas, para os que possuem baixo teor de extrato, a meses, para os de frutas e malte (SACHS, 2001).

#### **4.5 Caracterização do vinho e do vinagre**

O fermentado etanólico foi submetido a análises físico-química de sólidos solúveis, pH, teor etanólico, acidez total, acidez volátil e acidez fixa. Para a fermentação acética foram realizadas análises de pH, acidez total, teor etanólico, cinzas e extrato seco reduzido. No vinagre obtido também foram avaliados a presença de coliformes totais e fecais.

#### 4.5.1 Determinação do teor etanólico

Apesar da literatura citar baixos teores de etanol, a determinação da concentração de etanol (% de etanol em volume) foi realizada utilizando-se ebulliômetro, conforme aplicado no estudo de fermentação acética do maracujá por Brito et al (2000) e, também, na análise dos vinagres de mel da empresa Apícola Fernão Velho, em Maceió, Alagoas. O ebulliômetro, Figura 12, é composto de uma caldeira, onde fica a amostra a ser analisada, um condensador, que é acoplado à caldeira, onde são condensados vapores provenientes do líquido contido na caldeira, e uma lamparina, que fornece aquecimento à caldeira. Para a padronização do sistema e da temperatura de ebulição, primeiro foi realizado um teste com água destilada. Com um termômetro acoplado à caldeira, mediu-se a temperatura de ebulição, aguardando sua estabilização num tempo de aproximadamente 5 min. Com esta temperatura, ajustou-se o zero da escala. Para a análise das amostras, 50 mL foram transferidos para a caldeira do ebulliômetro, preenchendo o condensador com água para evitar a evaporação do etanol e acendendo a lamparina. A estabilização da temperatura de ebulição indicou o valor, que foi lido em régua com escala de graduação etanólica, em °GL.

**Figura 12** – Ebulliômetro utilizado para a determinação do teor etanólico.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

#### 4.5.2 Extrato seco reduzido

Para a determinação do extrato seco foram transferidos para uma cápsula previamente seca e tarada 25 mL de amostra, evaporando a mesma, lentamente, em banho-maria a 100°C durante 3 horas consecutivas. Em seguida, a cápsula com a amostra foi levada à estufa a 100°C por 30 minutos. Seu peso foi determinado após a transferência da cápsula da estufa para o dessecador, por no mínimo 15 min. A porcentagem de extrato seco foi definida pela Equação 12.

$$\% \text{ extrato seco (g/L)} = \frac{100.N}{P} \quad (12)$$

onde:

N = massa seca (massa final da amostra menos a tara da cápsula) (g)

P = volume tomado de amostra (mL)

#### 4.5.3 Determinação da acidez total

O método é baseado na titulação de neutralização de ácidos com solução padronizada de álcali (solução de NaOH 0,1 N) e com o uso de indicador fenolftaleína para soluções claras de vinho. A acidez total é expressa em meq/L para atender a legislação brasileira.

A determinação foi feita transferindo-se 3 mL da amostra para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, adicionando 50 mL de água destilada juntamente com 2 a 3 gotas de fenolftaleína. A titulação foi realizada com solução de hidróxido de sódio até coloração rósea persistente ou até o ponto de viragem (pH 8,2-8,4). O cálculo da acidez foi obtido a partir da Equação 13.

$$\text{ácidos totais (meq/L)} = \frac{n.N.f.1000}{V} \quad (13)$$

onde:

n = volume gasto na titulação da solução de NaOH (mL)

N = normalidade da solução de NaOH

f = fator de correção da solução de NaOH

V = volume total da amostra (mL)

#### 4.5.4 Determinação da acidez fixa

É obtida por evaporação da amostra, seguida de uma titulação dos ácidos residuais com álcali. Foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL um volume de 10mL da amostra juntamente com 100 mL de água destilada. O frasco foi levado para evaporar em banho-maria até a metade do volume, sendo resfriado em sequência, adicionado de 2 a 3 gotas de fenolftaleína e titulado com solução de hidróxido de sódio até coloração rósea. A determinação da acidez fixa foi conseguida pela Equação 14.

$$\text{ácidos voláteis (meq/L)} = \frac{n \cdot N \cdot f \cdot 1000}{V} \quad (14)$$

onde:

n = volume gasto na titulação da solução de NaOH (mL)

N = normalidade da solução de NaOH

f = fator de correção da solução de NaOH

V = volume total da amostra (mL)

#### 4.5.5 Determinação da acidez volátil

O cálculo da acidez volátil foi feito por diferença entre a acidez total e a acidez fixa.

#### 4.5.6 Determinação de coliformes

A presença de coliformes em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo (principalmente pasteurização),

evidenciando práticas de higiene e sanitização aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos (SILVA et al., 1997).

A análise de coliformes em alimentos foi realizada pela metodologia descrita pela American Public Health Association (APHA), citada no Compendium of Methods for the Microbiological Examination (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992). Emprega a técnica de Número Mais Provável (NMP), método que permite estimar a densidade de micro-organismos viáveis presentes em uma amostra sob análise, a partir de tabelas de probabilidade. Tem como vantagem o baixo custo, a recuperação de micro-organismos injuriados e a segurança (evita falso negativo). Como desvantagem, tem como características ser um método demorado e trabalhoso.

Inicialmente, foi feito o teste presuntivo, para uma série de 3 tubos, que fornece uma estimativa preliminar da densidade do grupo bacteriano baseada no enriquecimento em caldo lactosado. A produção de gás de fermentação no interior do tubo de Durham ou turvação indica a necessidade do teste confirmativo. Para coliformes totais, o teste foi conduzido em caldo verde brilhante a bile 2% e, para coliformes fecais, em caldo EC (*Escherichia coli*), sendo os resultados expressos por meio da técnica do número mais provável (NMP).

#### **4.6 Análise sensorial**

Para o vinho de laranja lima, foram realizadas análises sensoriais com 15 pessoas, ao passo que para os vinagres esse número subiu para 25 provadores, em função de melhor avaliação estatística dos resultados, todos não treinados, de ambos os sexos, incluindo graduação, pós-graduação, professores e funcionários da Instituição, escolhidos aleatoriamente entre as faixas etárias e classes sociais diferentes.

Amostras de 15 mL do substrato etanólico, previamente resfriada, foram codificadas com números aleatórios e servidas para os consumidores em copos com forma de tulipa (vinho) feito de material plástico. Os analistas foram orientados sobre o procedimento de intercalar as amostras com biscoitos cream cracker e água para remover o sabor residual da amostra anterior. A escala hedônica utilizada pelos provadores foi de 9 pontos, com o valor máximo correspondendo a "gostei muitíssimo", o médio a "indiferente" e o mínimo a "desgostei muitíssimo" (FERREIRA et al., 2000). Além disto,

foi avaliada a atitude dos consumidores em relação à frequência de consumo da bebida por meio de escala de ação de 9 pontos, com valor mínimo (1) correspondendo a “só beberia se fosse forçado” e máximo (9) a “beberia isto sempre que tivesse oportunidade”. Os dados das notas atribuídas foram quantificados e analisados estatisticamente. As letras representam a análise de variância e teste de Tukey para verificar as diferenças entre os resíduos, usando o programa de beta 7,4 Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2006), a 5% de probabilidade.

Para as amostras de vinagres, obtidos nos primeiros estudos na vinagreira I, foram realizadas análises sensoriais de cor e aroma a cada 15 dias, visando acompanhar o seu envelhecimento. As amostras foram codificadas com letras aleatórias e servidas para os consumidores em tubos de plástico. Os analistas foram orientados sobre o procedimento de, entre as análises do aroma das amostras, cheirar o pó de café, a fim de neutralizar o aroma entre uma amostra e outra.

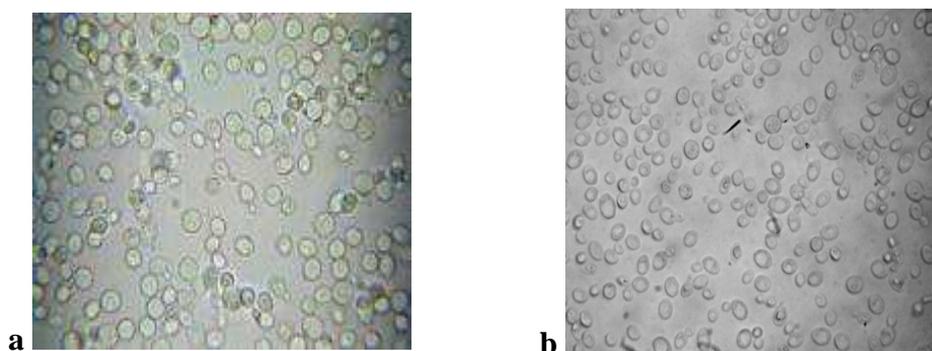
Para os vinagres com melhor aceitação de cor, aroma e em conformidade com a legislação, foi realizada análise sensorial de sabor, oferecendo aos 25 analistas uma salada contendo vinagre de laranja lima e assim avaliada a atitude dos consumidores em relação à frequência do consumo do vinagre. A degustação de alimentos pelo consumidor visa a melhoria do produto, considerando a preferências do mercado e até mesmo a adição de “ornamentos”, seguindo a preferência dos consumidores, eliminar ou evitar os que não são importantes, dar argumentos e certeza de venda, definir o preço do produto conforme a aceitação do mesmo e por fim, planejar embalagens com apelos práticos e estéticos (ABNT, 1993).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Crescimento, isolamento e caracterização dos micro-organismos nas etapas de fermentação

A caracterização das leveduras foi realizada em microscópio óptico BIOVAL, fazendo-se um esfregaço da cultura crescida em YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar), com o auxílio de uma alça de níquel-cromo em solução salina (NaCl 0,85%). A Figura 13 apresenta a visualização da levedura comercial (a) e da levedura codificada como RL 11 (b).

**Figura 13** – Microscopia das leveduras comercial (a) e RL 11 (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Na caracterização morfológica das colônias de leveduras, observou-se que a levedura comercial apresentou forma mais arredonda quanto que a levedura RL 11 apresentou-se em forma levemente oval.

A amostra da mãe do vinagre serviu como material para a visualização das bactérias acéticas. Foram observadas bactérias em forma de bastonetes ligeiramente curvos. A Figura 14 ilustra a visualização microscópica após a coloração de Gram, que apresentou coloração rosa, típica de bactérias Gram negativas. O teste da catalase auxiliou a identificar que as bactérias acéticas são catalase positivas, comprovando o metabolismo aeróbio das mesmas.

**Figura 14** – Visualização microscópica das bactérias acéticas do vinagre de laranja lima.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

## 5.2 Obtenção e caracterização físico-química da polpa de laranja lima

Primeiramente, averiguou-se o teor de suco, casca e bagaço na laranja lima, com a finalidade de se conhecer as características do fruto e o seu rendimento em suco. Os resultados obtidos, a partir de uma pequena amostragem, são apresentados na Tabela 1 e permitiram verificar que a densidade da laranja está em torno de  $1,06 \pm 0,12$  g/mL e o rendimento em suco de laranja lima, na faixa de  $45,46 \pm 6,87\%$ .

**Tabela 1** – Caracterização das laranjas lima.

Amostra	Volume de suco (mL)	Peso (g)		
		Total	Casca	Bagaço
1	92,0	199,19	9,22	85,41
2	108,0	203,90	8,75	93,54
3	98,0	213,82	14,29	98,93
4	63,0	191,00	11,05	98,08
5	96,0	184,68	10,32	82,18
6	105,0	220,35	11,59	102,94
7	75,0	184,62	11,44	92,01

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Na caracterização da polpa, apresentada na Tabela 2, foram determinadas acidez total, cinzas, umidade, pH, açúcares, proteínas, lipídios e sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix). Os resultados são apresentados pela média e o desvio padrão da análise em triplicata.

**Tabela 2** – Características físico-químicas da polpa de laranja lima.

Análise	Polpa
pH	5,8 ± 0,0
Sólidos solúveis (°Brix)	11,0 ± 0,0
Acidez (g AC. cítrico/ 100 g)	0,34 ± 0,06
Valor calórico (kcal/100g)	38,07 ± 0,93
Açúcares redutores totais (g/100 g)	11,35 ± 0,20
Carboidratos (g/100 g)	9,17 ± 0,22
Lipídios (g/100 g)	0,028 ± 0,005
Umidade (g/100 g)	89, 92 ± 0,08
Proteína (g/100 g)	0,30 ± 0,10
Cinzas (g/100 g)	0,48 ± 0,15
Vitamina C (mg/100 g)	28,71 ± 1,27

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

A porcentagem de sólidos solúveis totais está relacionada, principalmente, com o sabor do fruto, o qual inclui os açúcares e ácidos. Este constituinte também influencia o rendimento industrial, especialmente o peso final do produto processado. O teor de sólidos solúveis esteve próximo ao determinado por Sugai et al. (2002), que foi 10,99 para laranja pêra, e um pouco abaixo ao determinado por Brito et al (2000), de 12 para o fruto de maracujá, porém dentro do descrito por Benassi Jr. (2005), de 7 a 13,2%. Apresentou valores de pH, teor de sólidos solúveis e acidez superiores ao encontrado por Couto e Canniatti-Brazaca (2010).

A relação entre teor de sólidos solúveis e o teor de ácidos tituláveis (SST/ATT) é denominado de ratio, sendo uma das melhores formas de avaliar o balanço dos componentes do sabor doce e ácido do fruto. Industrialmente, o teor elevado da acidez total titulável diminui a adição de acidificantes, proporcionando melhoria nutricional, segurança alimentar e qualidade organoléptica (Rocha et al., 2001). O resultado obtido neste trabalho (32,35) foi abaixo do encontrado por Couto e Canniatti-Brazaca (2010), cujo valor foi 38,82, porém ainda acima do intervalo de preferência dos consumidores, que é de 15 a 18, em função da baixa acidez da fruta.

A concentração de açúcares, em torno de 11,4 g/100g, pode ser comparada com outras frutas tropicais como o de maçã, com 11,63 g/100g de açúcares (GOULARTE e

ANTUNES, 1999). Aliado aos bons resultados da vitamina C, pode-se concluir que o grau de maturação da fruta coletada para este trabalho gerou uma polpa de grande aceitabilidade.

### 5.3 Fermentação etanóica

As fermentações etanóicas foram desenvolvidas com diferentes concentrações iniciais de sólidos solúveis, contendo no mínimo 17°Brix e no máximo 28,1°Brix, estando dentro do que foi utilizado para produção de vinagres de maracujá, que foi de 20°Brix (BRITO, et al, 2000). No início do estudo, foi realizado trabalho comparativo do processo de fermentação etanóica com levedura comercial e RL 11, conduzida com a forma de produção laboratorial, apresentado pelo fluxograma da Figura 8. No final da pesquisa, o processo de fermentação etanóica foi conduzido de forma artesanal, pretendendo-se eliminar do processo a adição de metabissulfito, com o objetivo de simplificar ainda mais o processo. Contudo, os substratos etanóicos produzidos não foram bem aceitos na análise sensorial, fazendo com que a forma artesanal de produção de fermentados de laranja lima fosse conduzida adicionando metabissulfito de sódio, logo após o mosto passar pelo resfriamento rápido.

Um resumo dos estudos de fermentação etanóica realizados é apresentado na Tabela 3, sendo cada um dos substratos produzidos codificados por, substrato I, II, III, IV, V, VI e VII.

**Tabela 3** – Resumo do estudo de fermentação etanóica.

<b>Estudo realizado</b>	<b>Condução de produção</b>	<b>Substrato produzido</b>
Estudo inicial	Laboratorial	Substratos I, II, III e IV
Estudo final	Artesanal	Substratos V, VI e VII

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Para a produção do vinagre, as diferentes condições dos substratos etanóicos de laranja lima utilizados como matéria-prima são apresentadas na Tabela 4. Os processos de fermentação geraram bebidas de aparência limpa, sem adição de agentes clarificantes, separando o fermento apenas por trasfega.

Os substratos etanólicos obtidos apresentaram graduação etanólica mínima de 9,3 e máxima de 14,2. Segundo o Ministério da Agricultura (1997), fermentado de fruta é a bebida com graduação etanólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, o que indica que as bebidas estão em conformidade com a legislação.

De acordo com a Legislação Brasileira, lei nº 10970 de 12/11/2004, o teor etanólico permitido para vinhos leves é de 7 a 9,9°GL, para vinhos de mesa, 10 a 14°GL e para vinhos licorosos, 14 a 18°GL. Assim, os substratos II, V e VI foram classificados como leves, enquanto I, II, IV e VII como vinhos de mesa.

**Tabela 4** - Características do substrato etanólico de laranja lima usado para a produção de vinagre.

Amostra	Levedura	Fermentação etanólica			
		° Brix inicial	° Brix final	Etanol final (°GL)	pH Final
Substrato I	RL 11	28,1	13,9	14,2	3,32
Substrato II	RL 11	20,8	5,8	11,2	3,50
Substrato III	RL 11	17,6	5,8	9,3	3,43
Substrato IV	Comercial	17,0	5,6	10,0	3,42
Substrato V	Comercial	19,0	5,9	9,3	3,71
Substrato VI	Comercial	19,4	5,4	9,4	3,60
Substrato VII	Comercial	18,8	5,4	10,2	3,21

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

No que diz respeito à quantidade de açúcar residual no fermentado de fruta, a legislação (BRASIL, 1998) estipula três classes. A primeira, caracteriza os vinhos do tipo seco, com o açúcar até 5 g/L, a segunda, entre 5 e 20 g/L, como tipo meio seco (demi-sec) e a terceira é a classe de vinho suave, com mais de 20 g/L. Os substratos etanólicos foram classificados como meio seco, não muito favorável ao paladar dos analistas, que preferem os vinhos doces, segundo análise sensorial realizada no presente trabalho. No entanto, esta condição é ideal para o processo de fermentação acética, onde o interesse está na maior quantidade de etanol e dos compostos voláteis formados ao longo da fermentação.

O elevado tempo de fermentação pode ser justificado devido à influência da temperatura, desacelerando o processo fermentativo e contribuindo para a formação de

compostos responsáveis pelo aroma do produto. Em estudos de fermentação etanólica com abacaxi, utilizando uma temperatura de 20 °C, o tempo de fermentação durou 6 dias (CALDAS et al., 2006). Arruda et al. (2003), desenvolvendo fermentação etanólica com banana, à temperatura ambiente, obteve 10 dias de fermentação e, à 16 °C, o tempo de fermentação durou 18 dias.

A fermentação etanólica durou cerca de uma semana, exceto para os substratos etanólicos I e II, que levaram duas semanas para fermentar, devido à elevada concentração de sólidos solúveis utilizada nos mostos, bem como para o substrato VI e VII, produzido de forma artesanal, devido à utilização de fermento biológico seco.

A Figura 15 ilustra o processo fermentativo conduzido de forma artesanal desenvolvido no estudo (a) e o vinho de laranja lima obtido (b).

**Figura 15** – Processo de fermentação etanólica (a) e vinho de laranja lima (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

A relação entre a concentração dos sólidos dissolvidos, expressos em g/100g, e a concentração de etanol em função do tempo mostra que os substratos etanólicos I e II possuíram maiores concentrações de etanol no final da fermentação, em decorrência da elevada taxa de sólidos solúveis utilizado no início do processo.

Os substratos III e IV, mesmo utilizando leveduras diferentes, apresentaram características físico-químicas bastante semelhantes, tendo o substrato IV, que fez uso das leveduras comercial, com maior concentração de etanol no final da fermentação.

Os substratos V, VI e VII foram produzidos com tecnologia simples, conduzidos de forma artesanal, a cinética do processo assemelhou-se bastante aos vinhos produzidos com as técnicas utilizadas no laboratório, estando em boas condições para aplicação como matéria-prima na produção de vinagre.

A Figura 16 apresenta o comportamento cinético de etanol e de sólidos solúveis durante o processo de fermentação.

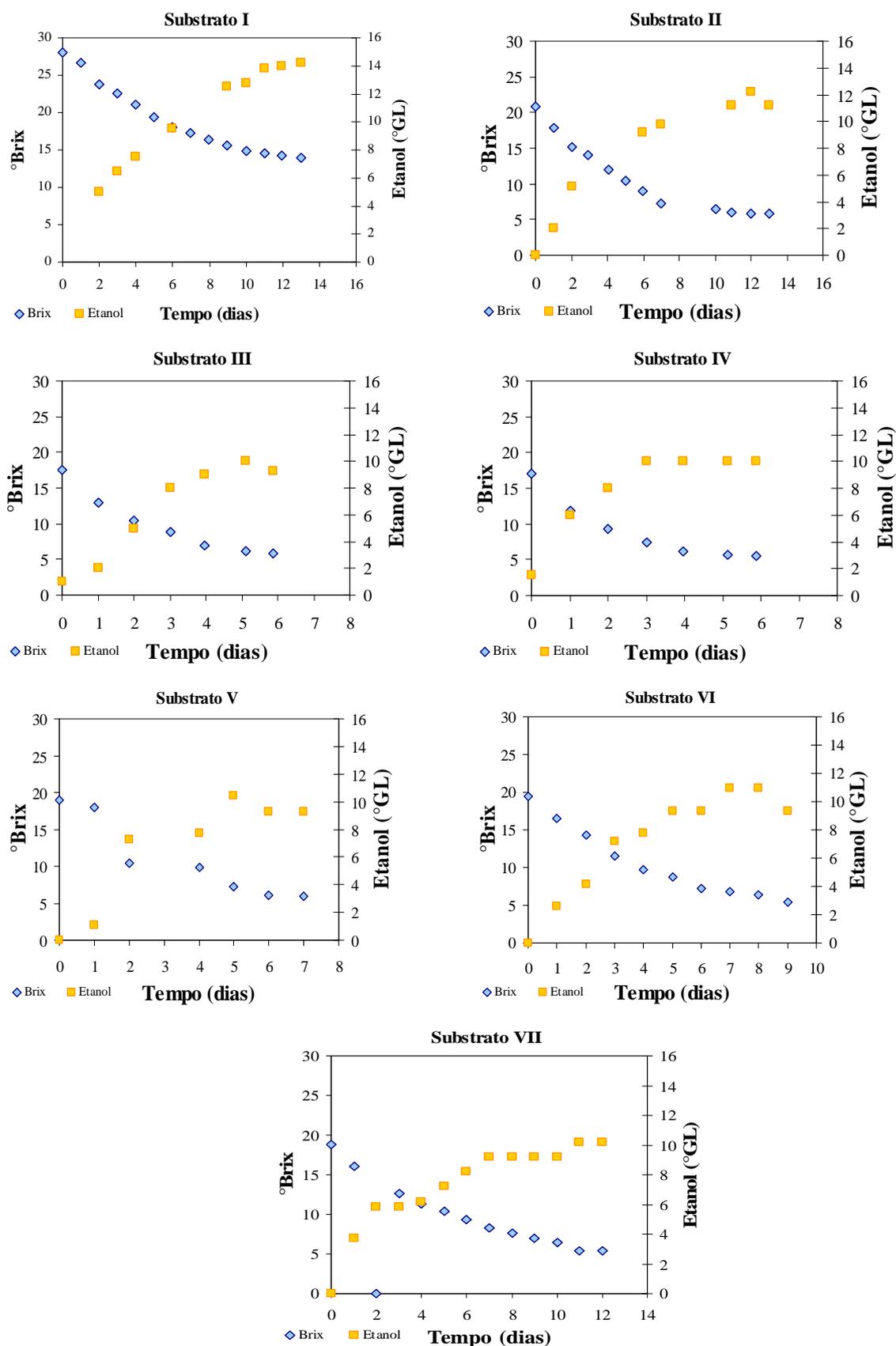
Os substratos conduzidos através da produção de forma artesanal (V, VI e VII), utilizaram concentrações de sólidos solúveis um pouco maior no início do processo, em comparação aos substratos III e IV, conduzidos de forma laboratorial. No entanto, suas características físico-químicas ao final do processo, assemelham-se.

Constata-se, ainda, que ao final da fermentação o °Brix permaneceu constante, na faixa de 5,4 a 5,9, provavelmente pela presença de açúcares não fermentescíveis no suco de laranja lima, exceto para o substrato I, o qual possuiu residual em açúcar de 13,9 °Brix em função do processo fermentativo com maior concentração inicial de açúcar, provocando a inibição e o retardamento do consumo do mesmo por parte das leveduras e resultando em uma maior concentração de açúcar residual ao final da fermentação (JACKMAN, 1991).

A concentração de etanol atingiu o pico máximo no substrato II, III, V e VI com 10,2, 10,0, 10,5 e 11,0% em volume, a 20 °C, respectivamente, diminuindo ligeiramente até o final do processo, sugerindo a possibilidade de redução no tempo de fermentação, desde que tal estratégia não interfira nas características de sabor e aroma da bebida.

Em todos os casos, a fase exponencial da fermentação ocorreu nos primeiros dias, com crescente consumo de açúcares e acidez aumentada. Na fase complementar, houve redução da atividade microbiana em função das elevadas concentrações de etanol, diminuição dos sólidos solúveis e da liberação de CO<sub>2</sub>.

**Figura 16** – Comportamento cinético do °Brix e concentração de etanol em função do tempo no processo de fermentação etanólica.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

A Tabela 5 apresenta a composição físico-química dos substratos conduzida com a forma de produção laboratorial.

**Tabela 5** – Características físico-químicas dos substratos de laranja lima obtidos a partir da forma de condução laboratorial.

Amostra	Substrato de laranja lima			
	Substrato I	Substrato II	Substrato III	Substrato IV
Levedura	RL 11	RL 11	RL 11	Comercial
pH	3,52 ± 0,00	3,50 ± 0,00	3,43 ± 0,01	3,45 ± 0,01
Sólidos solúveis (°Brix)	13,6 ± 0,0	6,9 ± 0,0	6,5 ± 0,1	6,2 ± 0,1
Etanol (°GL)	13,2 ± 0,6	14,1 ± 0,9	10,3 ± 0,6	8,7 ± 0,5
Acidez total (meq/L)	55,39 ± 0,95	48,18 ± 0,00	80,30 ± 3,21	85,66 ± 1,85
Acidez volátil (meq/L)	7,64 ± 0,00	2,25 ± 1,47	2,57 ± 1,70	2,78 ± 0,98
Acidez fixa (meq/L)	47,75 ± 0,99	45,93 ± 1,47	77,73 ± 2,23	82,87 ± 1,93
Cinzas (%)	0,38 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

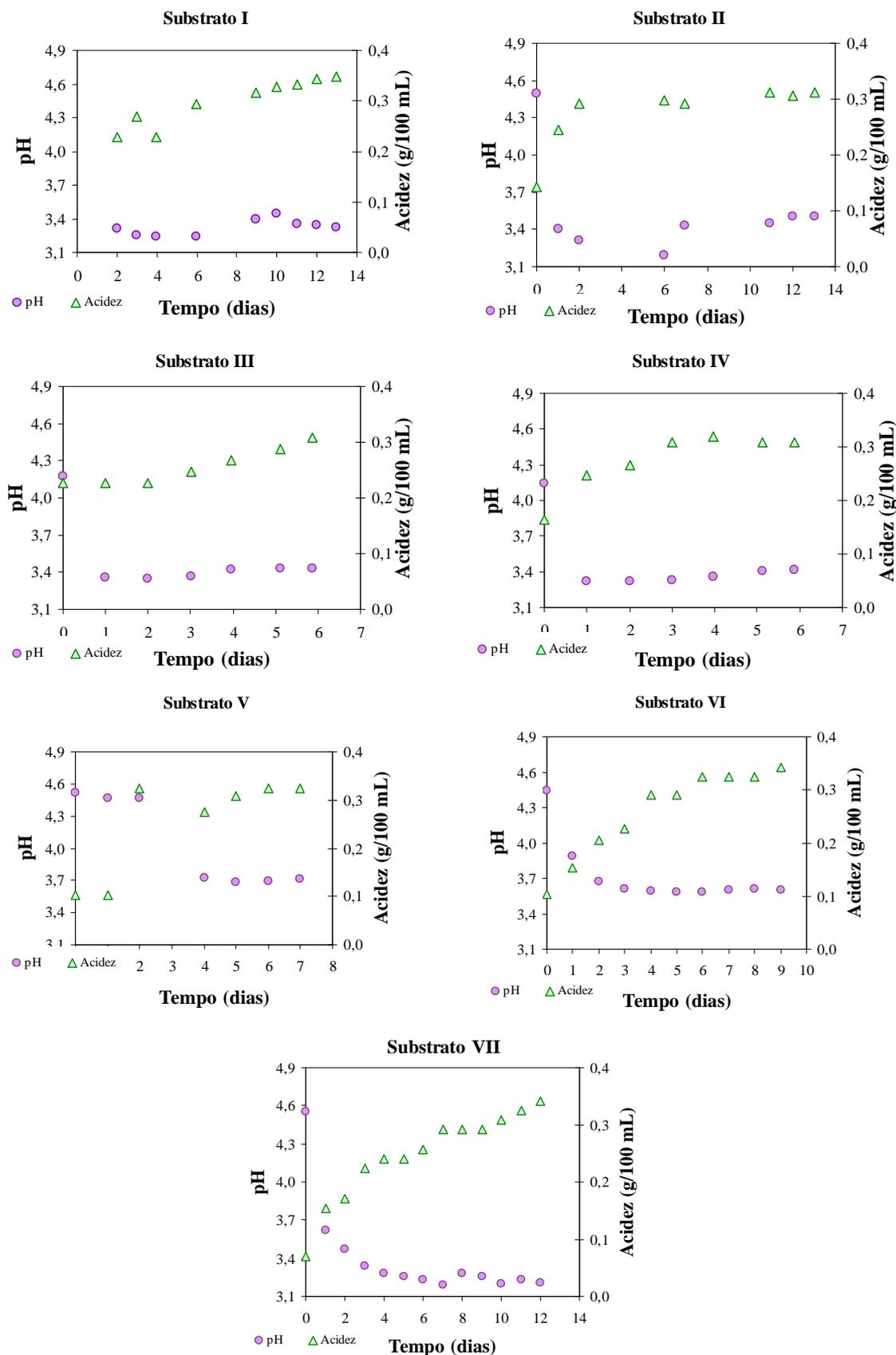
Os resultados obtidos indicam que a acidez total dos substratos I e II apresentaram-se próximo ao menor nível exigido pela legislação brasileira para vinhos de mesa (55-130 meq/L), enquanto que os substratos III e IV encontram-se dentro dos padrões. A acidez volátil, que indica a presença de ácido acético e seus derivados, distorcendo e alterando o aroma e o sabor do vinho fermentado (SANTOS et al., 2005), encontraram-se dentro dos níveis exigidos pela legislação (abaixo de 20 meq/L).

O acompanhamento cinético do pH e acidez total durante o processo de fermentação são apresentadas na Figura 17.

A determinação de acidez total titulável corresponde a todos os ácidos do produto, dissociados e não dissociados (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Já a medida de pH corresponde aos íons H<sup>+</sup> efetivamente dissociados (CECCHI, 2003), assumindo grande importância para que o processo de maturação ocorra de maneira adequada.

A acidez e o pH influenciam nas características sensoriais dos vinagres. Para vinagres com acidez na faixa de 5%, esperam-se pH em torno de 2,46 a 3,18, a depender do tipo de vinagre a ser analisado, como aqueles provenientes de destilados, vinho e frutas (WHITE, 1971).

**Figura 17** – Acompanhamento do pH e da acidez em função do tempo no processo de fermentação etanólica.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Pode-se constatar na análise das variações de pH e acidez total durante o processo fermentativo, que o pH diminuiu até o quinto e sétimo dias, tendo um aumento até sua estabilização, ao final da fermentação, à exceção dos substratos III e IV, no qual a diminuição do pH ocorreu até o segundo dia, por se tratar de substratos com menor tempo de fermentação etanóica. Em contrapartida, a formação da acidez total foi crescente até o final da fermentação, exceto para os substratos I e V, que apresentaram, no quarto dia, instabilidade da acidez, retornando a estabilidade apenas no final da fermentação.

É importante destacar que as mudanças na acidez e no pH durante a fermentação podem ocorrer por diversas razões, a exemplo de variações no consumo de fontes de nitrogênio, bem como à forte influência na estabilidade e coloração do fermentado etanóico (RIZZON et al., 1994; REINOLD, 1997 ).

Normalmente, o fermentado de fruta apresenta pH variando entre 3,0 e 4,0. O fermentado de laranja lima apresentou pH final mínimo de 3,21 e máximo de 3,71, sendo o substrato III com pH de 3,43 e o substrato IV com pH de 3,42, resultando em melhores resistências à infecções pois, segundo Hashizume (2001), o pH ideal para evitar contaminação é de 3,4. O início da fermentação se deu com pH em torno de 4,5, ajustado com adição de carbonato de sódio (VENTURINI FILHO, 2005).

O aumento da acidez durante o processo corresponde ao esperado, uma vez que nas etapas finais há um aumento dos teores de ésteres e redução das concentrações de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico (OETTERER, et al 2006). A acidez torna o produto menos susceptível à ação microbiana, principalmente de bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*, e bactérias gram-negativas, como *Acetobacter*, *Glucanobacter* e enterobactérias *Escherichia*, *Aerobacter*, *Klebsiella* (VENTURINI FILHO, 2005). Os fermentados de laranja lima obtiveram acidez total na faixa de 0,31 a 0,35 g/g.

A análise sensorial dos substratos I e II foi realizada comparando-os com um substrato já comercializado, denominado de substrato comercial. Provadores não treinados avaliaram a aparência, aroma e sabor da bebida, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 6, juntamente com o índice de aceitação, que é a relação entre a média obtida e a maior nota atribuída no julgamento.

**Tabela 6** – Avaliação sensorial dos substratos I e II.

Análise	Vinho de laranja lima		Vinho branco comercial
	Substrato I	Substrato II	
<b>Aparência</b>	7,2 ± 1,2	7,6 ± 1,1	7,8 ± 1,0
<b>Sabor</b>	6,8 ± 0,7	6,8 ± 2,0	7,1 ± 1,9
<b>Aroma</b>	6,9 ± 1,2	6,6 ± 1,2	7,6 ± 0,7
<b>Avaliação geral</b>	6,8 ± 0,9	6,8 ± 1,9	7,5 ± 0,8
<b>Teste de atitude</b>	4,1 ± 1,3	3,7 ± 1,7	3,8 ± 1,0
<b>Índice de aceitação (%)</b>	85,4	75,6	86,0

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

A pontuação dada no teste foi acima de 6 pontos na escala hedônica, o que significa “gostei ligeiramente”. Os índices de aceitação da bebida estão acima de 75%, sendo considerados produtos de boa aceitação em relação ao vinho branco comercial. Tais resultados mostraram, também, que o processo de fermentação pode ser otimizado para tornar o vinho de laranja lima com o mesmo padrão de qualidade ou superior ao vinho comercial. Os testes de atitude, que indicam como o analista julga a possibilidade ou não de consumo da bebida, foram na faixa de 4,0, que indica “gosto disto e beberia de vez em quando”.

#### 5.4 Fermentação acética

A fermentação acética ocorreu à temperatura ambiente, buscando-se as condições mais simplificadas possíveis para o desenvolvimento deste trabalho, que visa a transferência de tecnologia para pequenos produtores.

Várias tentativas foram feitas utilizando vinagre de mel como a mãe do vinagre, bem como vinagre orgânico de maçã, em um processo sem suporte, como ilustrado na Figura 18. Os mesmos não tiveram sucesso e, por isto, buscou-se em indústria uma cultura acética que pudesse ser o ponto de partida deste estudo, sendo, também, construídas as vinagreiras I e II.

**Figura 18** – Visualização do sistema inicial de fermentação acética.



Fonte: Acervo do laboratório.

Na vinagreira, a fermentação acética iniciou-se adicionando vinagre forte não pasteurizado ao substrato de laranja lima. O substrato etanólico foi recirculado diariamente até a formação da mãe do vinagre, uma substância polímera-gelatinosa, produzida pelos próprios micro-organismos, ilustrada na Figura 19, obtida de foto tirada da parte superior do suporte da vinagreira. O tempo estimado para o surgimento da mãe do vinagre foi de 15 dias em ambas as vinagreiras apresentadas neste estudo.

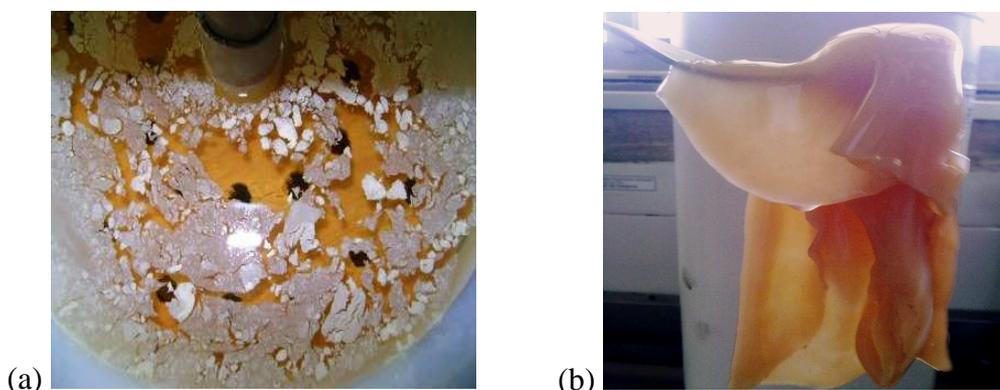
Como pode ser observado a partir da Figura 20a, na sexta semana a cultura microbiana preenchia quase que completamente toda a superfície do mosto, acima do suporte de madeira na vinagreira, tornando-se mais expressiva com o tempo. A Figura 20b permite a visualização do aumento da concentração bacteriana ao final do processo. Segundo Aquarone et al. (1990), a espessura da película aumenta com o tempo e acaba submergindo se não houver um suporte, atrasando o processo de fermentação acética, já que terá que se formar outra película, pois ela é quem mantém os micro-organismos na superfície do meio, em contato com o ar e o etanol ao mesmo tempo. Se a mãe do vinagre submergir no meio em fermentação, a mesma entrará em decomposição, provocando turvação do vinagre.

**Figura 19** – Formação da mãe do vinagre após 3 semanas de processo.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

**Figura 20** – Formação da mãe do vinagre após 6 semanas de processo (a) e substância polímera-gelatinosa (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Seguindo o que é citado na literatura, após a formação da mãe do vinagre, a recirculação continua a ser aplicada, porém com uma frequência menor do que no início do processo fermentativo, sendo então realizada em dias alternados.

O acompanhamento do processo de fermentação acética se deu pelas medidas de acidez, por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, e de teor etanólico, determinado através de ebuliômetro e expressa em % (v/v).

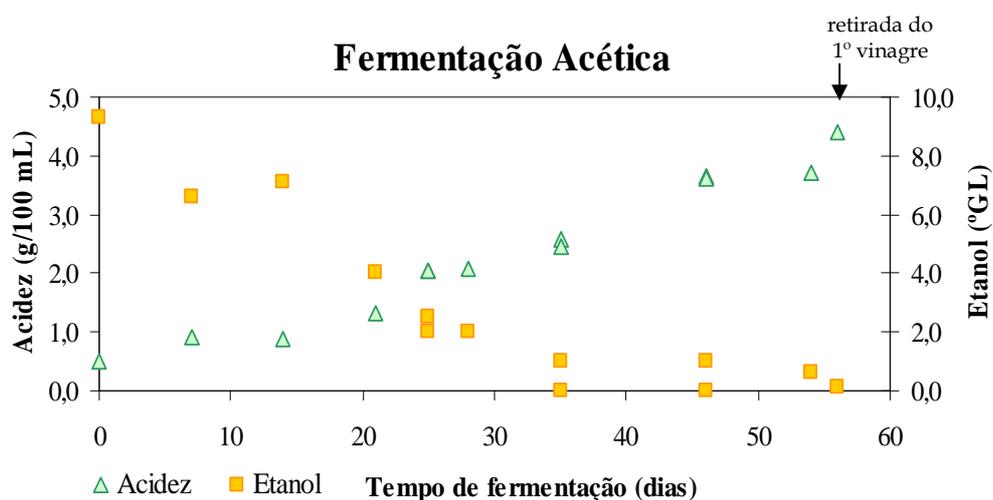
Ressalta-se que, ao utilizar métodos lentos de produção de vinagres, obtêm-se vinagres com teor etanólico maior 1% (v/v), visto que não se consegue obter ácido acético elevado a partir do etanol inicial (ARTIILES, ROMERO; TORRE, 1993). Todavia, o presente estudo mostrou que, ao utilizar as vinagreiras artesanais, que consistem em método lento de produção, baixos teores etanólicos foram atingidos. Como a acidez ainda se encontrava abaixo do estipulado pela legislação, que tem como 4% a acidez mínima

em ácido acético para vinagres, era preciso a adição de novo substrato etanólico. Ao alimentar a vinagreira com fermentado de laranja lima, há uma diluição do mesmo e, com isso, a quantidade de etanol no processo eleva-se pouco, bem como a concentração de ácido acético tem uma pequena queda. No entanto, a acidez é rapidamente recuperada e elevada pela transformação do etanol adicionado.

As fermentações acéticas foram conduzidas em duas vinagreiras, vinagreira I e II, sendo realizados dois estudos na primeira vinagreira e apenas um estudo na segunda vinagreira, sendo os vinagres obtidos na vinagreira II descartados por se apresentarem impróprios para o consumo. Os vinagres obtidos através da vinagreira I foram denominados EL e EA (primeiro vinagre; estudo 1), CB, CL e CA (segundo vinagre; estudo 1), PB, PL e PA (terceiro vinagre; estudo 1), NB, NL e NA (primeiro vinagre; estudo 2) e NB, NL e NA (segundo vinagre; estudo 2).

Na Figura 21 são apresentados os comportamentos cinéticos de consumo de etanol e formação de ácido acético, durante a produção do 1º primeiro vinagre obtido, no primeiro estudo de fermentação acética realizada na vinagreira I.

**Figura 21** – Comportamento cinético do primeiro vinagre produzido na fermentação acética da vinagreira I.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Verificou-se que, no 14º dia, houve um aumento do teor de etanol e uma pequena queda na acidez em ácido acético, resultado da falta de recirculação na segunda semana. Com o retorno da recirculação, ocorreu aumento de acidez e diminuição do teor etanólico até o 25º dia, quando, percebendo-se o surgimento da mãe do vinagre, verificou-se a importância da recirculação para ativação das bactérias acéticas. Em função do decréscimo de líquido ocorrido pela retirada de amostras, foram acrescentados 250 mL do substrato III, o que levou a um acréscimo de 0,5ºGL no teor etanólico, mantendo-se constante a acidez.

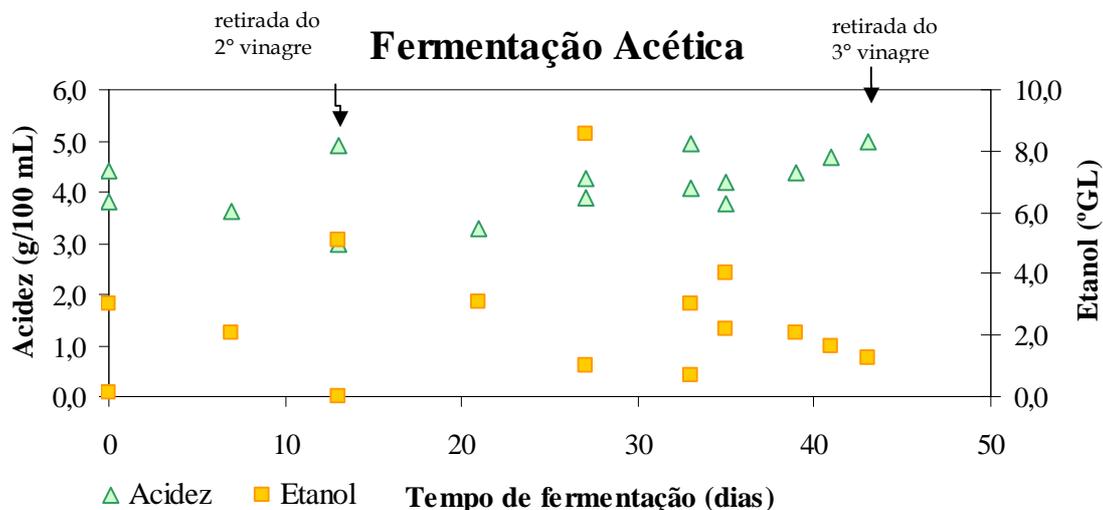
A análise em duplicata no 25º dia foi realizada em decorrência da queda do volume do substrato etanólico, fazendo com que a mãe do vinagre aproximasse do suporte de madeira, o que atrasaria a fermentação acética, havendo, então, a necessidade da adição de mais substrato etanólico e, conseqüentemente, nova análise. Nos 35º e 46º dias foram realizadas análises em duplicata, em função de não se observar indícios de etanol e a acidez estar fora dos padrões aceitáveis. Com a adição de mais substrato de laranja lima, houve aumento do teor etanólico a ser utilizado pelas bactérias acéticas na transformação de ácido acético, até os padrões aceitos pela legislação.

Com um mês e vinte seis dias, obteve-se um vinagre com 4,41 g de ácido acético/100 mL de vinagre, teor etanólico de 0,10 °GL e pH de 2,70, sendo retirado da vinagreira para avaliação da simulação do envelhecimento.

A partir da obtenção do primeiro vinagre, os demais vinagres foram então obtidos em pouco tempo, como mostra a Figura 22, em função da formação da mãe do vinagre.

Para obtenção do segundo vinagre, a vinagreira I foi alimentada com mais substrato de laranja lima, aumentando seu teor de etanólico para 3º GL. Como a acidez em ácido acético anterior foi de 4,41 g/100 mL, houve, então, a diluição da mesma, resultando em 3,81 g ácido acético/100 mL de vinagre, levando à realização da análise em duplicata no 11º dia. Devido o vinagre produzido anteriormente encontrar com a acidez inicial elevada, o tempo de obtenção de novo vinagre foi, conseqüentemente, mais rápido, levando apenas 13 dias após a obtenção do primeiro vinagre. O novo vinagre teve como composição 4,92 g ácido acético/100 mL de vinagre, ausência de etanol e pH semelhante ao anterior, que foi 2,7.

**Figura 22** – Comportamento cinético do segundo e terceiro vinagre produzido no primeiro estudo de fermentação acética na vinagreira I.



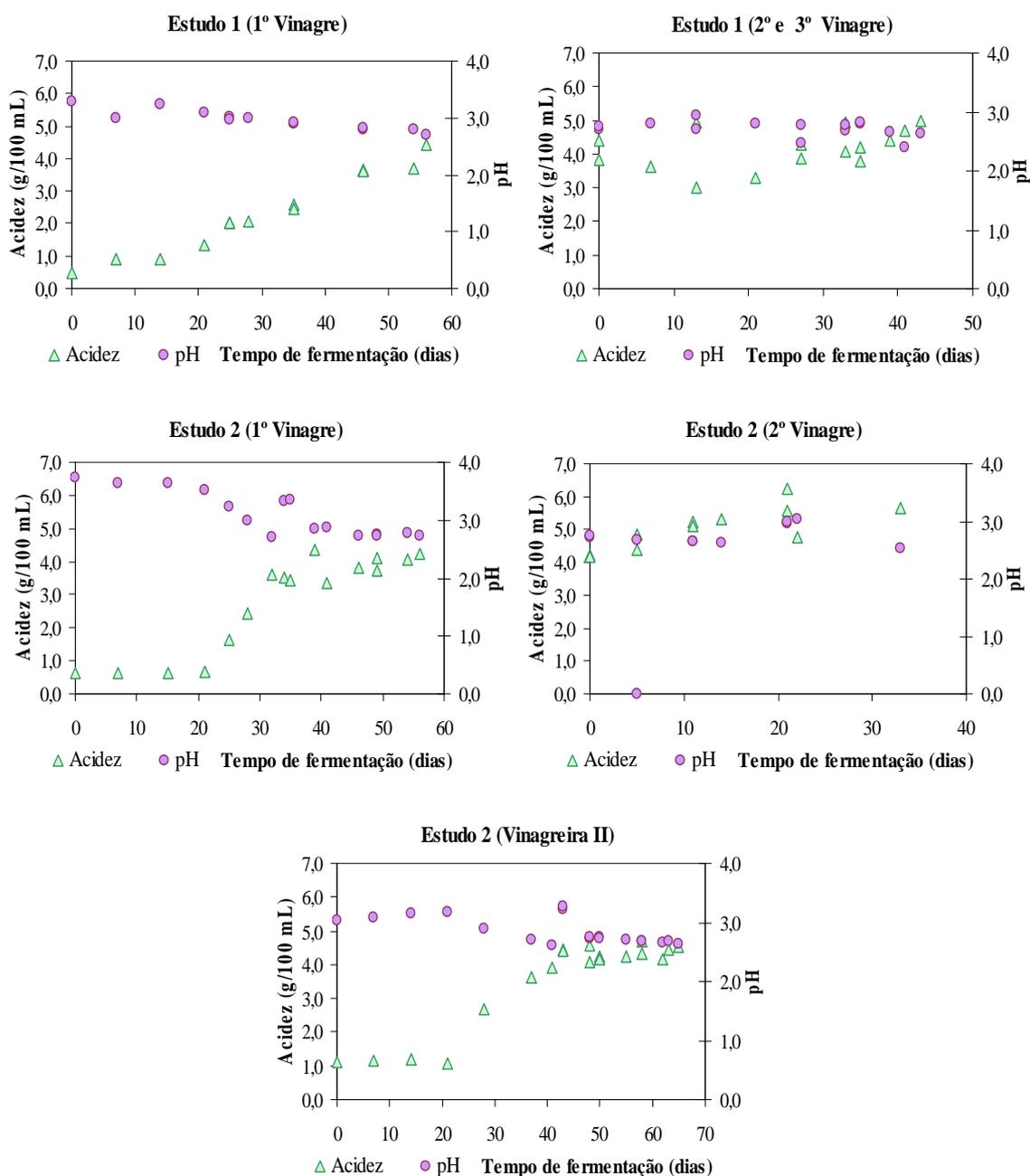
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

O terceiro vinagre do estudo 1, na vinagreira I, levou um pouco mais de tempo para obtenção, após 1 mês e um dia do segundo vinagre. A vinagreira foi alimentada logo após a obtenção do segundo vinagre, no 13º dia, e, apesar de no 27º dia haver vinagre, o volume do mesmo era baixo, sendo necessário alimentá-la. O mesmo ocorreu nos 33º e 35º dias, levando à medidas em duplicata. Este terceiro vinagre teve uma acidez e concentração de etanol um pouco maior, com 4,98 g de ácido acético/100 mL de vinagre e 1,23 °GL, respectivamente. Aquarone et al. (1983) citam que, em processos artesanais, não é recomendado toda utilização do etanol do vinho, pois o mesmo produzirá ésteres durante o envelhecimento.

Segundo Borzani et al. (1983), o aumento da acidez total e, conseqüentemente, a redução no pH ao longo do processo fermentativo, apresentado na Figura 23, são decorrentes da produção de ácidos orgânicos, como ácido lático, acético e succínico.

Pode-se constatar que o pH decresceu, enquanto a formação de ácidos foi crescente, como era esperado, até o final da fermentação, tornando-se quase que estável no final do processo fermentativo. Bortolini et al. (2001), Andrade et al. (2003) e Torres Neto et al. (2006) observaram comportamentos semelhantes na acidez e no pH durante o processo fermentativo.

**Figura 23** – Acompanhamento da acidez e do pH ao longo da fermentação acética.



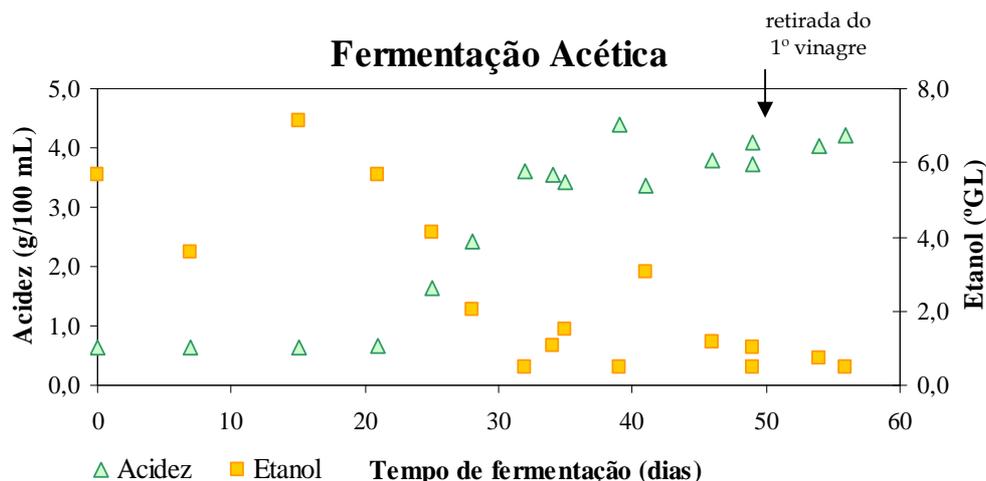
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Houve oscilação dos valores de acidez e pH, em todos os estudos de fermentação acética, sendo que o valor da acidez aumentava e o de pH diminuía nos dias em que a vinagreira não era alimentada com novo substrato. O contrário acontecia todas as vezes que a vinagreira era alimentada com novo substrato (fermentado etanólico de laranja), reduzindo a acidez por conta da diluição e aumentando o pH, exigindo a realização de

análise em duplicata nos dias em que a vinagreira era alimentada com novo substrato etanólico.

Na Figura 24 é ilustrada a cinética de consumo de etanol e formação de ácido acético ao longo de um segundo estudo de produção de vinagre utilizando a vinagreira I.

**Figura 24** – Comportamento cinético do segundo estudo de fermentação acética na vinagreira I.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

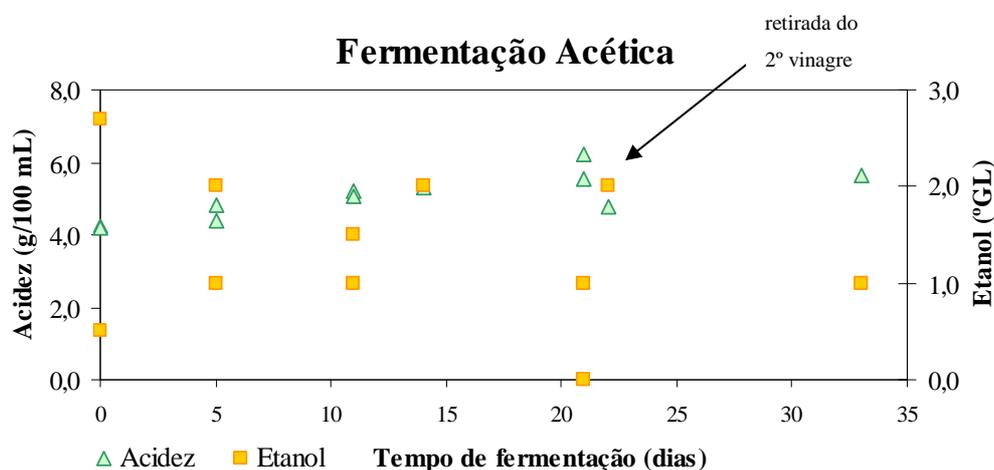
Com quinze dias, a vinagreira I necessitou de substrato etanólico, o qual já estava se aproximando da madeira de sustentação devido à evaporação, sendo alimentada e elevando o teor etanólico de 5,65 para 7,15 °GL. O surgimento da mãe do vinagre aconteceu com 25 dias, onde a fermentação começou a tomar partida, elevando de 0,63 a 1,65 g ácido acético/100 mL.

No 39º dia, obteve-se vinagre. Todavia, como o volume era pequeno, a vinagreira I foi alimentada e realizado o acompanhamento periódico de teor etanólico, pH e °Brix, até obtenção das condições aceitas pela legislação. O 49º dia mostra a realização de análise em duplicata, devido a nova alimentação da vinagreira, obtendo-se o produto no 56º dia com a 0,5 °GL, 4,22 g ácido acético /100 mL e pH 2,72. Este vinagre foi submetido à simulação de envelhecimento em padeço de madeira de pinho.

O processo continuou até a elaboração de um segundo vinagre, como mostra o comportamento cinético de consumo de etanol e formação de ácido acético na Figura 25.

A acidez manteve-se dentro dos aceitos por legislação, até mesmo em menos de 13 dias (tempo obtido na retirada do segundo vinagre do primeiro estudo). Todavia, como era desejada uma maior quantidade de vinagre, a mesma foi sendo alimentada com substrato etanólico de laranja lima no 1º, 5º, 11º e 21º dias, realizando análises em duplicata, mesmo que isso significasse uma pequena queda da acidez devido à diluição. Ao longo do processo fermentativo, o teor etanólico aumentou, transformando o etanol em ácido acético, pela ação das bactérias acéticas presentes na mãe do vinagre, até atingir os valores de 1 °GL, 5,66 g/100 mL e pH de 2,54.

**Figura 25** – Comportamento cinético do segundo vinagre produzido no segundo estudo de fermentação acética na vinagreira I.



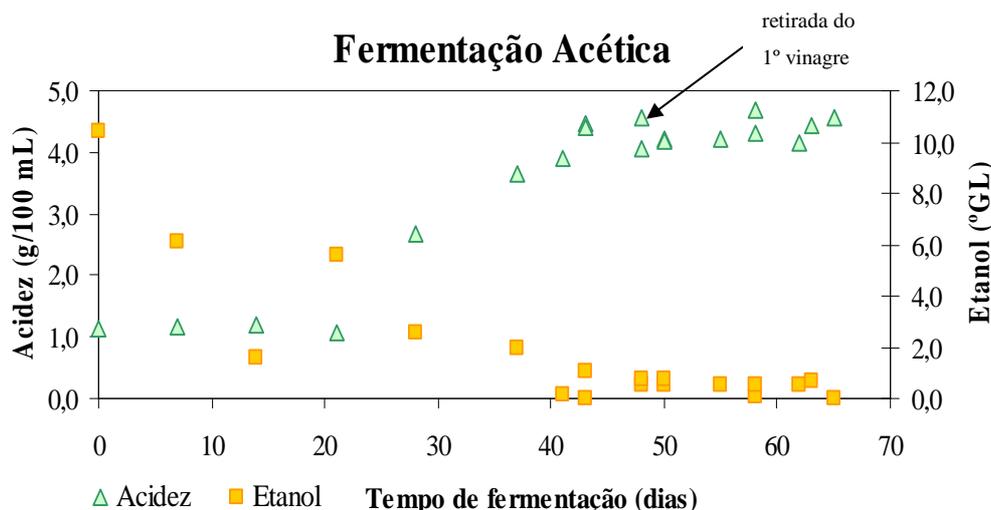
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Um segundo estudo de fermentação acética foi efetuado, utilizando uma vinagreira bastante semelhante à vinagreira I, mas contendo dois suportes de madeira e bagaço de cana-de-açúcar entre as mesmas, denominada de vinagreira II, visando obter vinagres em menos tempo e com melhores qualidades, devido à influência das duas madeiras.

A Figura 26 mostra o comportamento cinético de consumo de etanol e formação de ácido acético, ao longo do novo processo de fermentação acética, utilizando a vinagreira II.

Nos 21º, 43º, 48º, 50º e 58º dias, a vinagreira II foi alimentada em função do consumo do etanol e para aumentar o volume. Após 24 dias, notou-se o surgimento da mãe do vinagre, quando a fermentação, então, acelera. Em 1 mês e 15 dias obteve-se o novo vinagre.

**Figura 26** – Comportamento cinético do primeiro estudo de fermentação acética na vinagreira II.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Independente do tipo de vinagreira, o tempo para o surgimento da mãe do vinagre foi basicamente o mesmo. No primeiro estudo, com a vinagreira I, obteve-se a mãe em apenas 25 dias. Ao utilizar a mesma vinagreira para um segundo estudo, obteve-se novamente a mãe em 25 dias e ao utilizar a vinagreira II, em 24 dias.

Apesar da vinagreira II ter produzido um vinagre sem índices de etanol e 4,55 g ác. acético/100 mL, estando em conformidade com as exigências estabelecidas pela legislação, que são de no máximo 1 °GL de teor etanólico e no mínimo 4,00 g ácido acético/100 mL, o pH foi de 3,22, ultrapassando o limite aceito por lei, o qual varia de 2,69 a 2,83 para vinagres de vinho branco e 2,72 a 2,81 para vinagres de vinho tinto (EMBRAPA, 2008).

Também gerou um vinagre bastante escuro, possivelmente em função das duas madeiras utilizadas no processo, como pode ser observado na Figura 27, tornando inviável os estudos de envelhecimento e comercialização.

**Figura 27** – Vinagre sendo produzido na vinagreira II.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

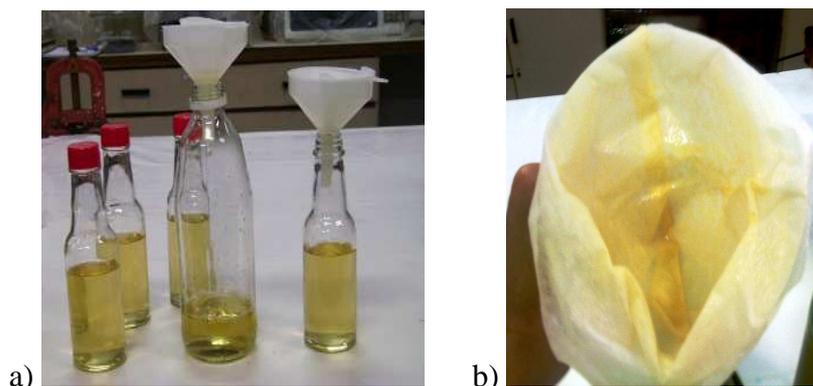
Apesar da diferença na quantidade de vinagre forte não pasteurizado inserido nas vinagreiras I e II, 7,14% e 10% em relação ao volume total, respectivamente, para dar início ao processo fermentativo, o tempo de surgimento da mãe do vinagre foi basicamente o mesmo, sendo a vinagreira com menor quantidade de vinagre forte não pasteurizado a que levou menos tempo para obtenção do vinagre.

#### 5.4.1 Filtração e pasteurização

Os vinagres, assim que obtidos, foram submetidos à filtração simples em papel de filtro qualitativo para a retirada de eventuais sujidades. Como pode ser observado na Figura 28, o processo apresentou poucas sujidades, mostrando-se como um líquido límpido e de aroma característico.

Após a filtração, o vinagre passou por um processo de pasteurização, ilustrado na Figura 29. O mesmo aconteceu em banho-maria à 65°C por 5 minutos, tempo este estabelecido em literatura para a eliminação de possíveis contaminantes no vinagre.

**Figura 28** – Filtração (a) e visualização de sujidades no vinagre (b).



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

**Figura 29** – Processo de pasteurização do vinagre.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

#### 5.4.2 Envelhecimento

Estudos com envelhecimento de vinagre foram realizados por Adami et al. (2012), utilizando aparas de madeira de carvalho americano e aparas de madeira cabriúva, mostrando aumentos do índice de fenóis totais, índice de antioxição e atividade seqüestrante de DPPH nos vinagres de etanol.

A Figura 30 ilustra o processo de simulação de envelhecimento dos vinagres em madeira, na presença e na ausência de luz, bem como os simulados ao envelhecimento sem nenhuma madeira contida dentro das garrafas PET (branco de cada vinagre).

A Tabela 7 apresenta as características iniciais dos vinagres obtidos no primeiro estudo com a vinagreira I, suas condições de envelhecimento, propriedades e codificações. A Tabela 8 apresenta o mesmo para os vinagres obtidos no segundo estudo de produção com a vinagreira I.

**Figura 30** – Simulação do envelhecimento dos vinagres.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

**Tabela 7** – Condições para envelhecimento dos vinagres no primeiro estudo de produção.

Vinagre	Envelhecimento	Condições físicas	Codificação	pH	Acidez (g/100 mL)	Etanol (°GL)
1°	Eucalipto	Presença de luz	EL	2,70	4,41	0,10
		Ausência de luz	EA			
2°	Cortiça	Branco	CB	2,70	4,92	0,00
		Presença de luz	CL			
3°	Pino	Ausência de luz	CA	2,64	4,98	1,23
		Branco	PB			
		Presença de luz	PL			
		Ausência de luz	PA			

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

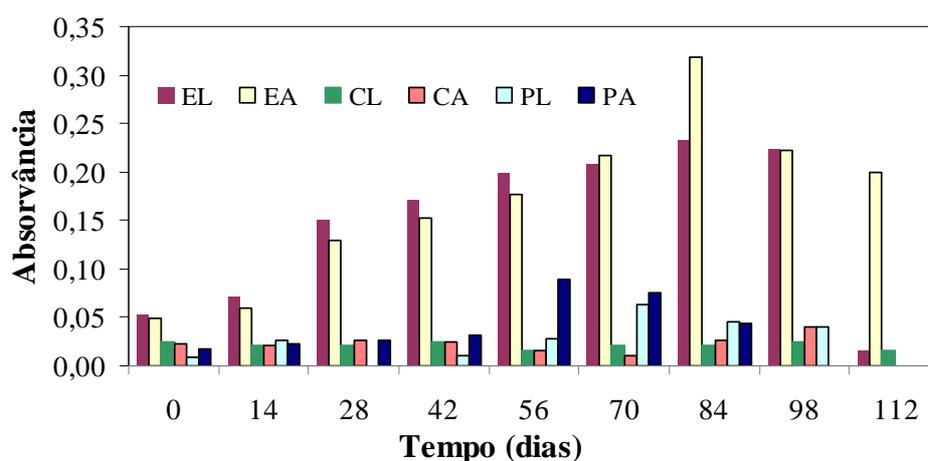
Os vinagres PB, PL e PA possuíram teor etanólico residual fora do aceito pela legislação. Os vinagres NB, NL e NA apresentaram maiores acidez. Mecca et al (1979) observaram que, durante a simulação do envelhecimento, a acidez fixa diminui, havendo formação de taninos e corantes. O pH de todos os vinagres encontram-se próximo ao encontrado do Marques et al (2010), que foi de 2,69, para vinagre de vinho tinto, com exceção dos vinagres dos NB, NL e NA, cujo seu valores é de 2,54.

**Tabela 8** – Condições para envelhecimento dos vinagres no segundo estudo de produção.

Vinagre	Envelhecimento	Condições físicas	Codificação	pH	Acidez (g/100 mL)	Etanol (°GL)
1°	Pinho	Branco	HB	2,72	4,22	0,50
		Presença de luz	HL			
		Ausência de luz	HÁ			
2°	Canela	Branco	NB	2,54	5,66	1,00
		Presença de luz	NL			
		Ausência de luz	NA			

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Foi realizado, num período de quatro meses e meio, a cada quinze dias, o acompanhamento da cor dos vinagres simulado ao envelhecimento na presença e ausência de luz, obtido no primeiro estudo de produção de vinagre com a vinagreira I. Em tal acompanhamento, ilustrado na Figura 31, efetuou-se a leitura das absorvâncias em comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm. Os vinagres com maiores leituras na absorvância apresentam coloração mais escura, assim como as que apresentam leitura menor na absorvância, apresentam coloração mais clara.

**Figura 31** – Leitura das absorvâncias dos vinagres no primeiro estudo de produção de vinagre.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Os vinagres de eucalipto (EL e EA) apresentaram desenvolvimento de cor, visualizado a partir do acréscimo da absorvância, até o 84º dia, sendo ao final da análise o vinagre EA com maior desenvolvimento de cor. Os vinagres simulados ao envelhecimento em rolhas de cortiça na presença e ausência de luz apresentaram leitura das absorvâncias bem próximas, sendo o CA com maior acréscimo da absorvância ao final da análise. Os vinagres simulados ao envelhecimento em pedaços de madeira de pino na presença e ausência de luz também apresentaram leitura das absorvâncias bem próximas, com exceção da amostra em presença de luz que apresentou uma grande elevação no 56º dia. Ao término da análise, os vinagres simulados ao envelhecimento na ausência de luz mostraram-se com coloração um pouco mais escura do que os envelhecidos na presença de luz. A influência da ausência da luz durante a simulação do envelhecimento dos vinagres resultou na acentuação da coloração dos mesmos, possivelmente atribuída a uma maior extração de compostos fenólicos da madeira para o produto envelhecido (MORI et al 2003; PLESSI; BARTELI; MIGLIETA, 2006), possivelmente contribuindo com o aumento do poder antioxidante nos vinagres (ALONSO et al., 2004).

A Tabela 9 mostra as análises de pH, acidez, etanol, como também de extrato seco e cinzas e seus desvio padrão, dos vinagres envelhecidos no primeiro e segundo estudos de fermentação acética na vinagreira I.

O pH dos vinagres envelhecidos sob as condições físicas de presença e ausência de luz foram iguais ou bastante parecidos. No entanto, observou-se um aumento naqueles envelhecidos em madeira, quando comparado ao branco. Segundo Guyton (2006), o pH do vinagre é idêntico ao do suco estomacal, ou seja, 3,0, não podendo ultrapassar tal valor, pois um acréscimo da concentração de ácidos pode causar azia, úlceras e mal estar. Assim, por terem apresentado faixa de pH entre 2,31 e 2,78, os vinagres obtidos não causam danos à saúde humana, desde que em consonância com a análise microbiológica.

Os vinagres produzidos através do método lento encontraram-se praticamente dentro dos padrões estabelecidos pela Portaria nº 745, de 24 de outubro de 1977, do Ministério da Agricultura, que definem acidez volátil mínima de 4g ácido acético/100mL, extrato seco mínimo de 6 g/L, teor de etanol residual máximo de 1ºGL e teor de cinzas mínimo de 1 g/L. A exceção se deu no extrato seco dos vinagres CB (3,38 g/L), CL (5,07 g/L), CA (5,24), HB (3,52 g/L), HL (3,04 g/L), NB, NL (3,21 g/L) e NA (4,75 g/L), os

quais possuem valores abaixo do exigido pela legislação, porém acima do encontrado por Zioli (2011), onde os fermentados acéticos de milho, arroz e cana-de-açúcar apresentaram valores de extrato seco, respectivamente, de 1,18, 1,20 e 1,46 g/L. Os vinagres com valor de extrato seco abaixo da média foram, em sua maioria, obtidos no segundo estudo de produção, com apenas um mês de envelhecimento. Segundo White (1971), uma estocagem do vinagre por determinado período de tempo em madeira poderia produzir modificações no seu conteúdo de sólidos e um maior tempo de envelhecimento, provavelmente, aumentaria a concentração de extrato seco, colocando-os dentro dos padrões de aceitação.

**Tabela 9** – Análises finais dos vinagres após envelhecimento.

Vinagre	Tempo de envelhecimento (meses)	pH	Acidez (g/100 mL)	Etanol (°GL)	Extrato seco (g/L)	Cinzas (g/L)
EL	9	2,41	4,30	0,00	6,18 ± 0,21	1,63 ± 0,11
EA		2,56	4,22	0,00	6,12 ± 0,35	2,01 ± 0,01
CB	8	2,39	4,90	0,00	3,38 ± 2,82	4,22 ± 0,06
CL		2,44	5,05	0,00	5,07 ± 0,19	3,30 ± 0,03
CA		2,44	5,37	0,00	5,24 ± 0,24	3,27 ± 0,07
PB	7	2,31	4,87	1,00	6,30 ± 0,21	4,57 ± 0,18
PL		2,41	5,23	1,00	6,97 ± 0,12	3,43 ± 0,07
PA		2,45	5,83	1,00	6,67 ± 0,38	2,46 ± 0,04
HB	1	2,69	4,47	0,30	3,52 ± 0,44	8,35 ± 0,00
HL		2,78	4,47	0,30	3,04 ± 0,52	8,68 ± 0,07
HÁ		2,78	4,41	0,30	7,20 ± 5,75	11,37 ± 0,18
NB		2,46	6,68	1,00	3,21 ± 0,03	8,24 ± 0,05
NL	1	2,55	6,18	1,00	3,21 ± 0,00	8,21 ± 0,02
NA		2,54	6,27	1,00	4,75 ± 2,08	7,83 ± 0,09

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

A Tabela 10 mostra os parâmetros iniciais e finais dos vinagres, ou seja, antes e após a simulação de envelhecimento dos vinagres, com seus respectivos tempos de simulação, que foram de 9 meses para os vinagres em madeira de eucalipto, 8 meses para os vinagres em rolhas de cortiça, 7 meses nos vinagres simulados ao envelhecimento em madeira de pinho e 1 mês aos vinagres em madeira de pinho e canela.

**Tabela 10** – Parâmetros iniciais e finais dos vinagres.

<b>Início da simulação de envelhecimento</b>			
<b>Vinagre</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez (g/100mL)</b>	<b>Etanol (°GL)</b>
EL e EA	2,70	4,41	0,10
CB, CL e CA	2,70	4,92	0,00
PB, PL e PA	2,64	4,98	1,23
HB, HL e HA	2,72	4,22	0,50
NB, NL e NA	2,54	5,66	1,00
<b>Término da simulação de envelhecimento</b>			
<b>Vinagre</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez (g/100mL)</b>	<b>Etanol (°GL)</b>
EL	2,41	4,30	0,00
EA	2,56	4,22	0,00
CB	2,39	4,90	0,00
CL	2,44	5,05	0,00
CA	2,44	5,37	0,00
PB	2,31	4,87	1,00
PL	2,41	5,23	1,00
PA	2,45	5,83	1,00
HB	2,69	4,47	1,00
HL	2,78	4,47	0,30
HÁ	2,78	4,41	1,00
NB	2,46	6,68	1,00
NL	2,55	6,18	1,00
NA	2,54	6,27	1,00

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

O processo de simulação de envelhecimento permitiu uma queda no pH e de etanol, onde o mesmo variou de 0 a 1% (p/v), mostrando semelhança ao estudo de caracterização de vinagres brasileiros realizado por Rizzon e Miele (1998), onde a média dos valores de etanol nos vinagres analisados foi de 0,14% (p/v), com variação de 0,04 a 0,22%.

Houve um aumento da acidez nos vinagres simulados ao envelhecidos na madeira, sendo na ausência de luz aqueles com maiores concentrações em ácido acético, o que provavelmente está relacionado ao aumento de polifenóis, que contribuem para o poder antioxidante, passarem da madeira para os produtos envelhecidos (ALONSO et al., 2004). Não há uma precisão nos resultado dos vinagres obtidos no segundo estudo de fermentação acética devido ao curto tempo da simulação do envelhecimento. Ainda assim, foi possível perceber um aumento na acidez.

A Figura 32 mostra as amostras de todos vinagres obtidos durante o processo de fermentação acética utilizando a vinagreira I, a qual imita o processo Orleans.

**Figura 32** – Visualização das amostras de vinagres.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

## 5.5 Análise sensorial

Observa-se a ausência de estudos avaliando sensorialmente vinagres simulados ao envelhecimento em madeira, nas condições físicas de presença e ausência de luz. Isto fez com que o presente trabalho definisse alguns requisitos para aceitação dos vinagres.

Durante a simulação de envelhecimento, foram avaliadas a suavidade, aroma e sabor do vinagre, a partir de análises sensoriais, levando-se em consideração os atributos de cor, sabor e aroma, para se conhecer a aceitação do produto final.

Antes de submeter os vinagres à análise sensorial, foram realizadas análises microbiológicas de coliformes, onde constatou ausência de formação de gás já no teste

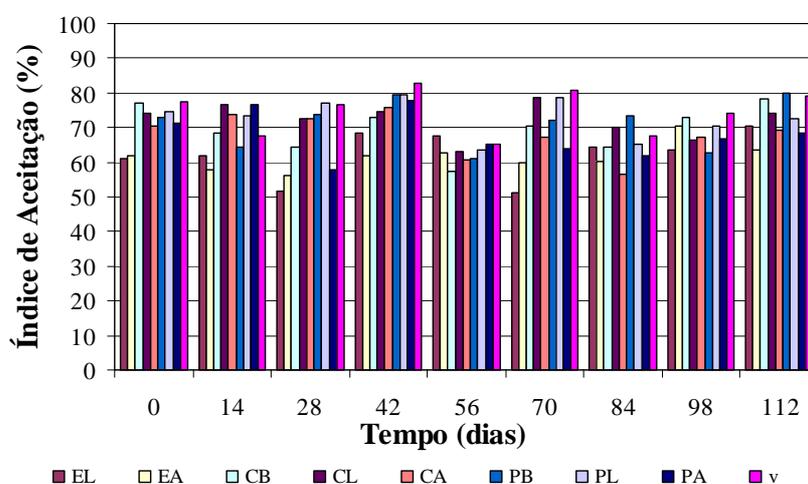
presuntivo. Os resultados assim indicam a não turvação ou formação de gás, estando os vinagres livres de qualquer contaminação microbiológica.

A análise sensorial de cor e aroma foi realizada com os primeiros vinagres obtidos em estudo inicial com a vinagreira I, comparando-o com um vinagre já comercializado no mercado. Esta análise ocorreu a cada quinze dias, num período de quatro meses e meio.

Os vinagres EL e EA começaram a ser analisados com aproximadamente 4 meses de simulação de envelhecimento, os CB, CL e CA, com 3 meses de simulação de envelhecimento, e os PB, PL e PA com 2 meses de simulação de envelhecimento.

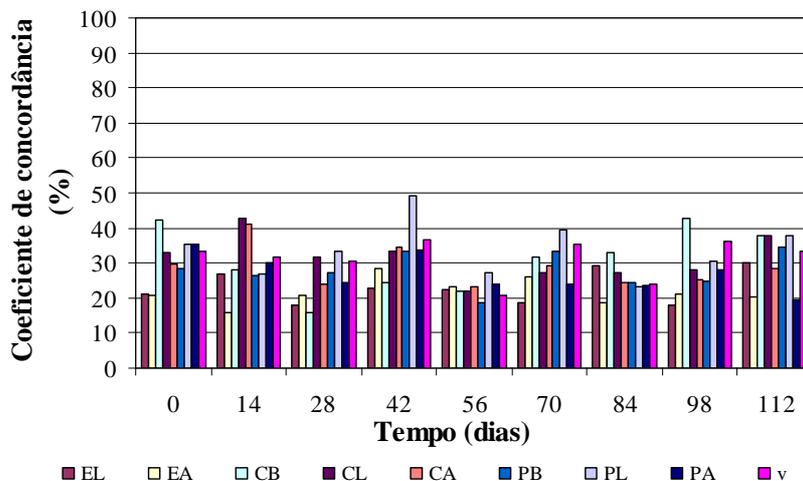
As Figuras 33 e 34 ilustram a avaliação da cor dos vinagres pelo índice de aceitação e o índice de concordância das notas entre os julgadores, respectivamente, onde observou que aqueles com coloração mais escura, ou seja, os vinagres EL, EA e os simulados ao envelhecimento na ausência de luz, foram os vinagres de menor aceitação.

**Figura 33** – Índice de aceitação da cor do vinagre.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Um produto tem, estatisticamente, chances de sucesso no mercado se o índice de aceitação for igual ou superior a 70%. Observou-se uma aceitação semelhante ao vinagre de maçã já comercializado, denominado v, em vinagres simulados ao envelhecimento em pedaços de madeira de pino na presença de luz (PL) e em rolhas de cortiça na presença de luz (CL), bem como seus brancos.

**Figura 34** – Índice de concordância da cor do vinagre.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

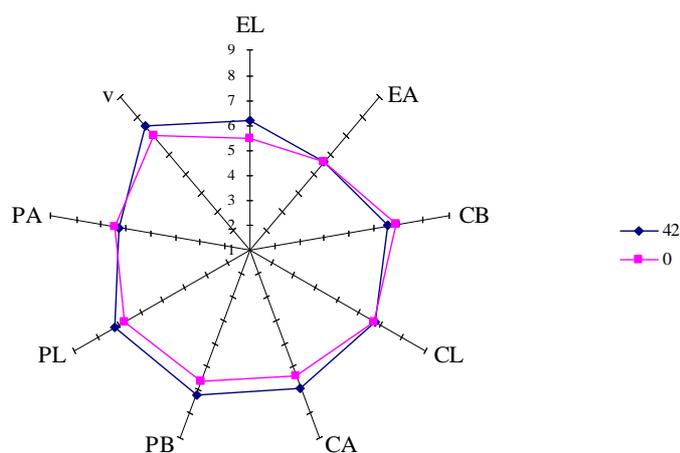
O índice de concordância das amostras avalia as notas atribuídas pelos julgadores. Por ser um painel de leigos, ou seja, julgadores não treinados, verificou-se uma pequena concordância nas amostras em virtude do não discernimento dos compostos de aroma.

Contudo, pode-se notar uma relação entre os índices de aceitação e de concordância, obtendo-se nos primeiros 42 dias resultados constantes para os vinagres, os quais caíram em 56 dias, havendo um pequeno aumento nas avaliações seguintes, até sua estabilização com 112 dias.

As Figuras 35 e 36 apresentam a média das notas dos vinagres simulados ao envelhecimento, avaliados pela escala hedônica de 9 pontos, entre os primeiros 42 dias e entre os dias restantes.

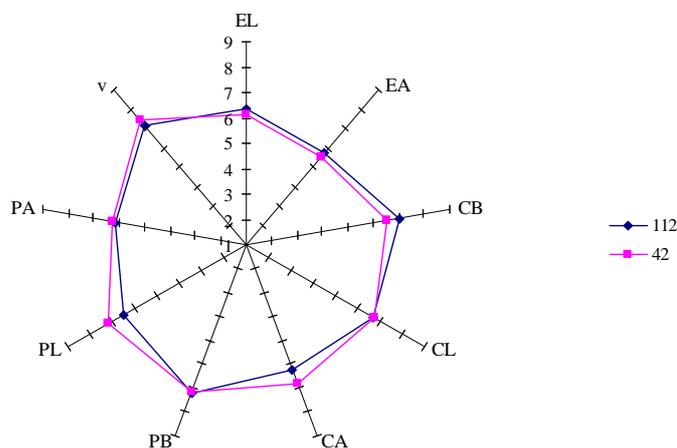
No início da análise de simulação do envelhecimento, a média das notas atribuídas à cor dos vinagres estiveram entre 5 e 6 pontos na escala hedônica de 9 pontos. Após 42 dias, esta média permaneceu constante para os vinagres EA e CL, havendo um aumento das notas para a escala de 6 a 7 pontos, nos vinagres EL, CA, PB e PL, indicando melhoria nos compostos voláteis, os vinagres CB e PA apresentou uma pequena queda nas notas.

**Figura 35** – Média das notas da cor do vinagre entre 0 à 42 dias.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

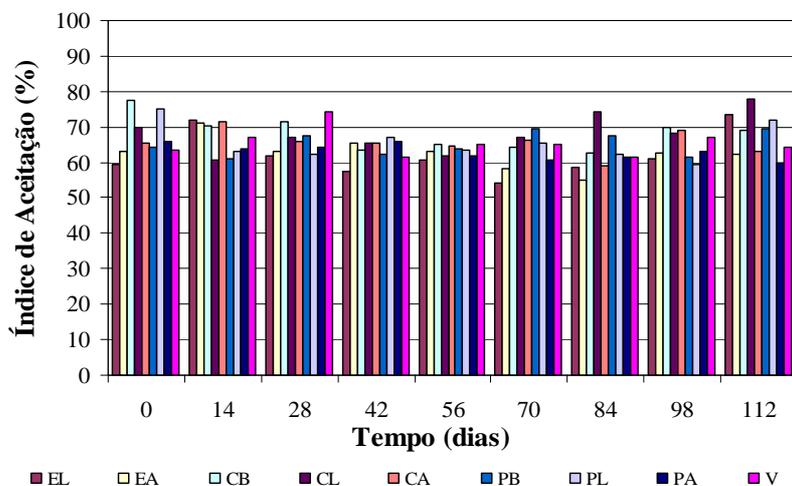
**Figura 36** – Média das notas da cor do vinagre entre 42 à 112 dias.



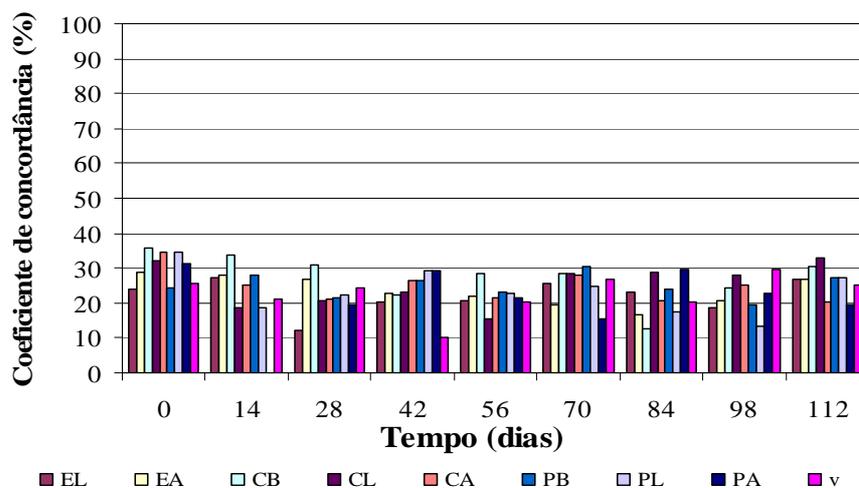
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Ao chegar ao final da avaliação com 112 dias, o vinagre EL continuou a apresentaram um aumento na nota, os vinagres EA e CB aumentaram sua preferência, havendo uma queda na notas para as amostras CA e PL, assim como para o vinagre de maçã já comercializado, uma constância na média entre 6 e 7 pontos foi verificado nas amostras CL, PB e PA .

As Figuras 37 e 38 mostram o índice de aceitação e o coeficiente de concordância das notas dadas ao aroma dos vinagres, respectivamente. É importante salientar que o cheiro não tão bem agradável de ácido acético, torna a pontuação da análise longe de 9 pontos, ou seja, da maior nota da escala hedônica.

**Figura 37** – Índice de aceitação do aroma do vinagre.

Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

**Figura 38** – Coeficiente de concordância da avaliação do aroma dos vinagres.

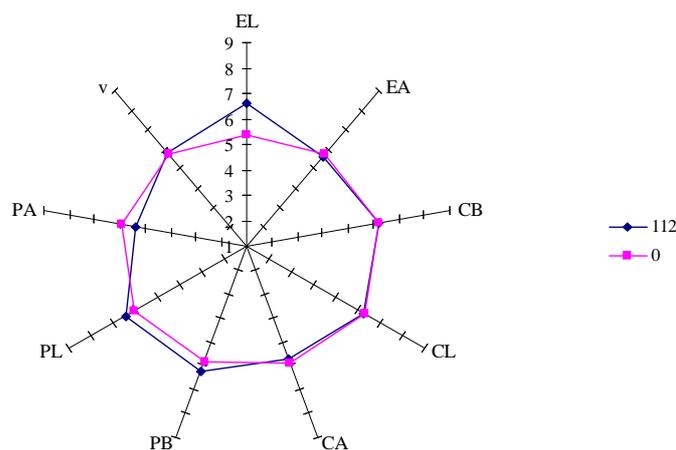
Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Poucas amostras alcançaram índice de aceitação igual ou superior a 70%, até mesmo para o vinagre comercial, corroborando a dificuldade desta análise por analistas sem treinamento. Todavia, foram obtidos bons resultados, entre 60 e 70%, nos vinagres simulados ao envelhecimento em pedaços de madeira de eucalipto (EL e EA), cortiça (CB, CL e CA) e de pino na presença de luz (PL). Existiu uma relação entre os índices de

aceitação e de concordância, com os vinagres apresentando resultados praticamente semelhantes ao longo dos 112 dias de simulação de envelhecimento.

A Figura 39 apresenta a média das notas atribuídas ao aroma dos vinagres simulados ao envelhecimento, seguindo a escala hedônica de 9 pontos.

**Figura 39** – Média das notas atribuídas ao aroma do vinagre.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

No início, a média das notas atribuídas ao aroma dos vinagres apresentaram valores entre 5 e 6 pontos, aumentando ou permanecendo constante até o final da simulação do envelhecimento. Os vinagres simulados ao envelhecimento em pedaços de madeira de eucalipto na presença de luz (EL) e de pinho, tanto o branco quanto na presença de luz (PB e PL), foram as que possuíram incrementos na média atribuída a partir da escala hedônica.

Para análise sensorial de sabor, não foram avaliados os vinagres simulados ao envelhecimento em pedaços de madeira de eucalipto, como também os simulados ao envelhecimento em rolhas de cortiça e os obtidos no segundo estudo de produção de vinagre, devido ao pouco tempo de simulação de envelhecimento e, conseqüentemente, não atingirem a concentração de extrato seco exigida pela legislação.

Os vinagres avaliados foram os simulados ao envelhecimento com pedaços de madeira de pinho (PB, PL e PA), por estarem límpidos e transparentes, bem como dentro das especificações da legislação. Foram realizadas análises em escala hedônica de 9 pontos, avaliando-se o sabor e a atitude quanto ao consumo do vinagre. O Quadro 6

detalha a pontuação da escala hedônica, já o Quando 7 detalha a pontuação da escala hedônica em relação a atitude do consumo do vinagre pelo analista e a Figura 40 ilustra a média das notas obtidas.

**Quadro 6** – Pontuação da escala hedônica.

Notas	Análise sensorial
1	Desgostei muitíssimo
2	Desgostei muito
3	Desgostei regularmente
4	Desgostei ligeiramente
5	Indiferente
6	Gostei ligeiramente
7	Gostei regularmente
8	Gostei muito
9	Gostei muitíssimo

Fonte: BRASIL, 2005.

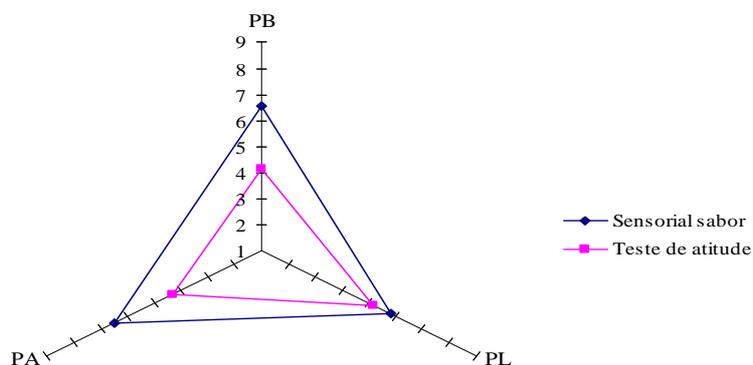
**Quadro 7** – Pontuação da escala hedônica em relação a atitude do consumidor.

Notas	Teste da atitude
1	Usaria isto sempre que tivesse oportunidade
2	Usaria isto muito frequentemente
3	Usaria frequentemente
4	Gosto disto e usaria de vez em quando
5	Usaria se estivesse acessível, mas não me esforçaria para isso
6	Não gosto disto, mas usaria ocasionalmente
7	Raramente usaria isto
8	Só usaria se não pudesse escolher outra bebida
9	Só usaria isto se fosse forçado

Fonte: BRASIL, 2005.

O vinagre PB simulado ao envelhecimento, sem nenhum material de enchimento, foi o que obteve melhor aceitação, com média de 6,52, aproximando-se a “gostei regularmente”, na análise sensorial de sabor. Conseqüentemente, apresentou melhor resultado no teste de atitude, com média de 4,16, o que significa “gosto disso e usaria de vez em quando”. Na segunda posição, veio o vinagre obtido em ausência de luz (PA), ficando em último lugar na aprovação dos julgadores o vinagre simulado ao envelhecimento na presença de luz (PL), com resultado aproximando-se a “gostei ligeiramente” e teste de atitude a “usaria se estivesse acessível, mas não me esforçaria para isso”.

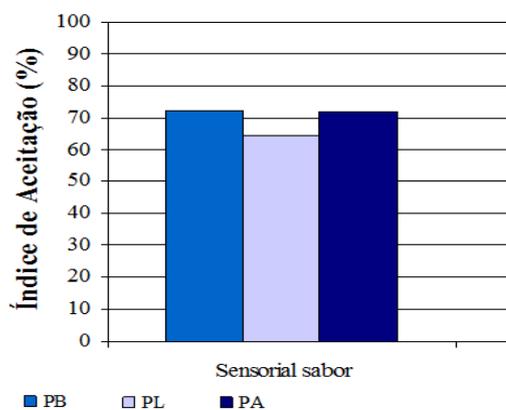
**Figura 40** - Média da análise sensorial de sabor e teste de atitude.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

O índice de aceitação da avaliação do sabor dos vinagres analisados é apresentado na Figura 41.

**Figura 41**- Índice de aceitação da análise sensorial de sabor.



Fonte: Autora desta dissertação, 2012.

Os vinagres PB e PA obtiveram índices de aceitação um pouco superior a 70%, indicando uma probabilidade de aceitação no mercado consumidor pelo produto desenvolvido nestas condições.

## 6 CONCLUSÕES

O fruto de laranja lima encontra-se em boas condições físico-químicas para a produção de substrato etanólico, levando em consideração que os vinagres elaborados de fruta conservam seu poder nutricional, encontramos no fruto da laranja lima, grande poder antioxidante e teor de ácido ascórbico.

A inoculação do mosto de laranja lima utilizando fermento biológico seco instantâneo mostrou-se tão eficaz quanto à utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, codificadas como RL-11, sendo o fermento biológico de melhor interesse aos produtores devido a seu fácil acesso e baixo custo.

A produção caseira do fermentado de laranja é vantajosa e, mesmo simplificando o processo, não fazendo o uso de enriquecimento protéico para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e mantendo-a em garrafas durante o período de fermentação etanólica, mostrou-se simples e eficaz devido ao seu baixo custo e facilidade de obtenção do fermentado da laranja.

A fermentação etanólica normalmente foi encerrada quando a concentração de sólidos solúveis residuais esteve na faixa de 5,4 a 5,9, classificando-os como secos, à exceção do substrato I, que obteve uma maior concentração de açúcares sem fermentar, em função da elevada taxa de açúcar no início da fermentação.

Todos os fermentados de laranja lima possuíram uma graduação etanólica dentro do recomendado pela legislação vigente, que é de quatro a quatorze por cento em etanol em volume, a 20°C, sendo o substrato I com concentração um pouco fora do permitido.

A produção de vinagre através do processo rápido, denominado Alemão, realizada na vinagreira II, mostrou-se ineficiente, devido ao grande aumento da coloração do vinagre, por conta da utilização de um tipo diferente de madeira. Assim, utilizando-se apenas uma madeira, pelo processo lento (vinagreira I), obtiveram-se vinagres com coloração aceitável.

Os vinagres obtidos a partir do processo Orleans, com a vinagreira I, levaram o mesmo tempo de produção, um mês e vinte e seis dias, mesmo utilizando concentração de vinagre forte não pasteurizado diferenciada, onde inicialmente foi 10% e, no final do estudo, 7,15%.

Os vinagres encontraram-se livres de contaminação microbiológica e dentro da legislação, fora a análise de extrato seco nos vinagres envelhecidos em cortiça e nos vinagres com baixo tempo de envelhecimento, indicando ser esta variável fundamental para atingir os valores aceitáveis do produto.

A simulação do envelhecimento na madeira colabora para a diminuição do pH e do teor etanólico, aumentando a acidez e o aroma dos vinagres, o que, provavelmente, causaria a formação de polifenóis, aumentando o poder antioxidante do produto.

Os vinagres com melhor aprovação apresentaram coloração mais clara e menor concentração em ácido acético. Assim, é sugerido trabalhar com o envelhecimento na presença de luz, por conta do pequeno aumento na coloração, e com concentração de ácido acético abaixo de 4%, pois durante o envelhecimento tal concentração eleva-se até os parâmetros de aceitação.

Na análise sensorial de sabor, bem como no teste de atitude, o vinagre de pinho simulado ao envelhecido sem nenhuma material de enchimento (PB) foi o mais aceito.

A produção de vinagre de laranja lima representa uma das alternativas para agregar renda às pequenas famílias, valorizando, assim, a produção local do fruto.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, A. K. S., VIANA, V.C., ARAUJO, A.G.T., NARAIN, N. **Secagem de Resíduos do Processamento de Abacaxi como uma Alternativa de Incorporação em Biscoitos**. In: 7º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, 2007.

ADAMI, G.M.; VASCONCELOS, M.O.; PIRES, A.L.R.; BELLINI, M.Z. **Enriquecimento de vinagre de álcool através do envelhecimento com aparas de madeira**. Disponível em: < [http://prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_35065506833.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_35065506833.pdf)> Acesso em: 31 mar.2 012, 20:50:02

ADAMS, M.R. Small-scale vinegar production from bananas. **Tropical Science**, v. 20, n. 1, p. 11-19, 1978.

ADAMS, M.R. Vinegar. In: WOOD, B.J.B. Microbiology of fermented foods. London: **Elsevier Applied Science**. v. 1, p. 1-44. 1998.

ADAMS, M.R.; TWIDDY, D.R. Performance parameters in the quick vinegar process. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.9, p.369-373, 1987.

ALMEIDA, M.M.; SILVA, F.L.H.; CORADO, L.D; FREIRE, R.M.M.; VALENÇA, A.R. Caracterização física e físico-química do fruto de mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p.15-20, 2009.

ALONSO, A.M.; CASTRO, R.; RODRIGUEZ, M.C.; GUILLEN, D.A.; BARROSO, C.G. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. **Food Research International**, v. 37, p. 715-721, 2004.

AMERINE, M.A.; BERG, H.W.; CRUESS, W.V. **The technology of wine making**. 2 ed. Westport: AVI, 1997.

AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação etanólica: Ciência e tecnologia**. Piracicaba: Editora Pancrom, p. 4-7, 2005.

ANDRADE, J.S.; PANTOJA, L.; MAEDA, R.N. Melhoria do rendimento e do processo de obtenção da bebida etanólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.23. p. 34-38, 2003. Suplemento.

ANTONINI, S.R.C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2004. Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Econômica Rural, Centro de Ciências Agrárias.

AQUARONE E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na Produção de Alimento**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 4. p.22. 2001.

ARAÚJO, I. A. DE. **Obtenção do Etanol por Fermentação Alcoólica**. Rio Largo: IAA PLANALSUCAR (COONE), 1982, 83 p.

ARRUDA, A. R.; CASIMIRO, A. R. S.; GARRUTI, D. S.; ABREU, F. A. P. Processamento de bebida fermentada de banana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 2, p. 161-167, 2003.

ARTILES, A. A.; ROMERO, C. D.; TORRE, A. H. Caracterization fisicoquimica de diferentes tipos de vinagres: determination de algunos parametros de naturaleza volátil. **Alimentaria**, v. 11, p. 105-107, 1993.

ARRUDA, M.C.; JACOMINO, A.P.; KLUGE, R.A.; AZZOLINI, M. Temperatura de armazenamento e tipo de corte para melão minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.1, p.74-76, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12994**: Análise sensorial dos alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1993.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14. ed, p.500. Arlington, 1984.

BAKER, R. A.; CRANDALL, P. G.; DAVIS, K.C.; WICKER, L. Calcium supplementation and processing variable effects on orange juice quality. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 5, p. 1369-1371, 1991.

BELLINI, M.Z. **Caracterização bioquímica dos vinagres brasileiros**. Campinas, 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

BELMONT. **Vinagre Belmont saudável como vinho**. Indústria de Vinagres Belmont., Lençóis Paulista. Disponível em: <<http://www.vinagrebeltmont.com.br>>. Acesso em: 07 mar. 2011, 21:37:08

BENASSI JÚNIOR, M. **Avaliação da influência do grau de maturação do fruto cítrico na composição química e sensorial de refrigerantes, refrescos e energéticos à base de suco de laranja**. Campinas, 2005. 215 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BILSKA, V. Industrial use of acetic acid bacteria and characterization of the genes responsible for production of biotechnologically significant products, **Bulletin Potravinarskeho Vyskumu** (Slovakia), 1996, v. 35(4) p. 181-191 v. 58(3). p.321-326.

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

BORZANI, W; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. (orgs.).  
**Biotecnologia Industrial**. 1.ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2001.

BRASIL. Decreto n.º 99.066 de 08 de março de 1990: Regulamenta a Lei 7.678, de 8 de Novembro de 1988, que Dispõe Sobre a Produção, Circulação e Comercialização do Vinho e Derivados do Vinho e da Uva. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 de março 1990.

BRASIL. Decreto n.º. 2.314, de 05 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de setembro de 1997.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Portaria nº 368, de 04/09/97. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. Brasília, 1997.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instituição Normativa n.36 de 14 de outubro de 1999. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para fermentados acéticos. Seção 1, p. 76, Brasília, 15 de outubro de 1999.

BRASIL. **Ministério da Agricultura**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Inspeção de Produto Vegetal. Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Cerveja, Vinho, Vinho de Frutas, Fermentado de Cana, Saquê, Filtrado Doce, Hidromel, Jeropiga, Mistela, Sidra, Vinagre. Brasília: Imprensa Nacional, p.109, 1974.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa n.30, de 26 de junho de 2005. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br>. Acesso em: 20 jul. 2011, 17:55:06.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). Agrost. Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROSTAT.html>. Acesso em: 28 mar. 2012, 18:24:12

BRITO, D.Z.; PITTA, M.N.; ZILIOLI, E.; JUNIOR, V.S.; SPINOSA, W.  
**Comportamento das fermentações alcoólica e acética de maracujá para produção de vinagre**. 2000. Faculdade de Ciências e Letras. Engenharia Biotecnológica.

CAMOCHENA, S.; FERREIRA, E. S. **Avaliação de vinagre comercial por medidas de condutância**. Paraná, 2006. p. 323. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

CALDAS, M.C.S.; MANFROI, L.; NETO, B.A.M.; SANTOS, J.S.; NASCIMENTO, L.A.; CARVALHO, E.A.; CARVAJAL, J.C.L.; MENDONÇA, F.H.O. **Elaboração de fermentado alcoólico de abacaxi**. I Jornada Nacional da Agroindústria. Bananeiras, 2005.

CANAS S., BELCHIOR A.P., MATEUS A.M., SPRANGER M.I., BRUNO-DE-SOUSA R., Kinetics of impregnation/evaporation and release of phenolic compounds from Wood to brandy in experimental model. **Ciência e Técnicas Vitivinícola**, p.1-17, 2002.

CARBONELL, M. 1970. **Tratado de Vinicultura**. (Prémio Agrícola AEDOS) Barcelona, Editorial Aedos, p. 242.

CARVALHO, H.H.; JOMG, E.V.; BELLO, R. M. **Alimentos: métodos físicos e químicos de análises**. 1.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.180, 2002.

CASTELO. **Indústria de Vinagres Castelo**. Disponível em: <http://www.vinagrecastelo.com.br>. Acesso em: 07 de mar. 2011, 13:15:06.

CHARLES, M., MARTIN, B., GINIES, C. ETIEVANT, P., COSTE, G., GUICHARD, E. Potent aroma compounds of two red wine vinegars. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 70-77, 2000.

CHAGAS, N.V.; ROSA, M.R.; REIS, A.H.; TORRES, Y.R.; SANTOS, J.N.T.; RIGO, M. Estudo de cinética de fermentação alcoólica por células de *Saccharomyces cerevisiae* em mel diluído. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 10 n. 2, 2008.

CASTRO, A.G., POUZADA, A.S. Embalagens para Indústria Alimentar. **Ciências e Técnicas**. Instituto Piaget. Lisboa. p.17-19, 2002.

CEAGESP. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2004. Disponível em: [http://www.ceagesp.gov.br/hortiescolha/anexos/ficha\\_laranja\\_lima.pdf](http://www.ceagesp.gov.br/hortiescolha/anexos/ficha_laranja_lima.pdf). Acesso em: 11abr. 2011, 14: 25:05.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Ed. da Unicamp. Coleção Livro Texto, 2003. p. 208.

CHEN, C. S.; SHAW, P. E.; PARISH, M. E. Orange and Tangerine Juices. In: NAGY, S.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E. **Fruit juice processing technology**. Florida: Agscience. cap. 5, p. 110-165. 1993.

CHIARELLI, R. H. C.; NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI, F. W. G.; Fermentados de Jabuticaba (*Cauliflora Berg*): Processos de Produção, Características Físico-químicas e Rendimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8., n.4., p. 277-282., 2005.

CHINNICI, F., NATALI, N.; SPINABELLI, U.; RIPONI, C. Presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in woody chips used as adjuvant in wines, vinegars and distillates, **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 40, n.9, p. 1587-1592, 2007.

COELHO, Y. S. da; **Citricultura em Alagoas: Referência Nacional na Produção de Laranja 'Lima'**. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Série Cítrus em Foco, N°25, Jul. 2004.

- COLWILL, J. S. Food acceptability and sensory evaluation. In: MACRAE, R.; ROBINSON, R. K.; SADLER, M. J. (eds). **Encyclopaedia of Food Science, Food Technology, and Nutrition**. Londres: Academic Press, 1993.v.6.
- COPERSUCAR. Fermentação, 1a ed, **Centro de Tecnologia COPERSUCAR – CTC**, Divisão Industrial – CTDI, São Paulo/SP, 1987.
- CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, R. J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.
- COSTA, C. M.; TAKAHASHI, J. S.; VILLAMONTE, M. R. **Produção de vinagre**. Florianópolis: UFSC, 2006.
- COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30. p. 15-19, maio 2010. Suplemento.
- CREPALDI, D, V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, Â. A. P.; MELO, D. C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E. Biologia reprodutiva do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n 3/4, set. 2006.
- DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 325-330, 2005.
- DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWINGS, J. Family VI. *Acetobacteriaceae*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore:Williams e Wilkins, 1984. v. 1, p.267-277, 1984.
- DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 342-350, 2003.
- EBIHARA, K, NAKAJINA, A. Effect of acetic and vinegar on blood glucose and insulin responses to orally administered sucrose and starch. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.52, n.5, p. 1311-1312, 1988.
- EBNER, H. Vinegar. IN: Reed, G. (ed.) **Industrial Microbiology**. Westport : AVI (Audio Video Interleave), 1982. 883p. p. 802-834.
- EMBRAPA. Sistema de Produção de Vinagre – Dez.2008. Disponível na Internet: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 07 de mar. 2011, 15:05:45.
- ENTANI, E.; TSUJIHATA, S.; TSUKAMOTO, Y, OHTA, M. Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including Escherichia coli O157: H7. **Journal of Food Protection**, Dês Moines, v. 61, n. 8, p. 953-956, 1998.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989.

- FERRAZ PEDROSO, P. R. **Produção de vinagre de maçã em biorreator airlift**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Florianópolis, 2003. Universidade Federal de Santa Catarina.
- FERREIRA, V. L. P. (Coord.). **Análise sensorial - Testes discriminativos e afetivos**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, p.77, 2000.
- FERTONANI, H. C. R. **Estabelecimento de um modelo de extração ácida de pectina de bagaço de maçã**. Ponta Grossa, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG.
- FUKAYA, M.; PARK, T. S.; TODA, K. Improvement of acetic acid fermentation by molecular breeding and process development. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 6, p. 447-454, 1992.
- GARCIA-PARRILLA, M.C.; HEREDIA, F.J.; TRONCOSO, A.M. Phenolic composition of wine vinegars produced by traditional static methods. **Nahrung**, v. 41. n. 4. p. 232-235, 1997.
- GARRUTI, D. S.; CASSIMIRO, A. R. S.; ABREU, F. A. P. **Processos agroindustriais : Elaboração de fermentado de caju**. Comunicado Técnico on line 82. Fortaleza-CE, 2003.
- GARRUTI, D.S. et al. **Caracterização sensorial de pedúnculos de clones de cajueiro anão-precoce cultivados sob sequeiro e irrigação, para consumo *in natura***. In: Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, RS. SBCTA (Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos), 2002. p.1898-1901, 2002.
- GOULARTE, V.D.S.; ANTUNES, P.L. Caracterização físico química de maçãs Fuji concentradas com açúcares e desidratadas. **Revista Brasileira de Agrociências**, v.5, n. 2, 149-151. mai-ago,1999.
- GRANANDA, G. G.; MENDONÇA, C. R. B.; ROSA, V. P.; ZAMBIAZI, R. C. Vinagres de folhas de videira: aspectos sensoriais. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 18, n.1, p. 51-56, 2000.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.
- HADFIELD, L. C.; BEARD, L. P.; LEONARD-GREEN, T. K. Calcium conten of soup stocks with added vinegar. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 89, n. 12, p. 1810-1811,1989.
- HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. in: BORZANI, W. et al. **Biotechnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v.4, p. 21-68, 2001.
- HEINIG. **O uso alternativo do vinagre Heinig**. Heinig Indústria de Plásticos e Vinagre, 12 p, Brusque, 2001.

- HENDRIX, C. M.; REDD, J. B. **Chemistry and technology of citrus juices and by-products**. In: ASHURST, P. R. Production and packaging of non-carbonates fruit juices and fruit beverages. London: Blackie Academic e Professional, 1995. cap. 2, p. 53-87.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994.
- HROMATKA, O.; EBNER, H. **Vinegar by submerged oxidative fermentation**. Industrial and Engineering Chemistry, v. 51, n. 10, p. 1279-1280, oct. 1959.
- IFT. Institute of Food Technologists. Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. **Food Technology**, Chicago, v. 35, n.11, p.50-57, 1981.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.
- INVEST NE, 2008. Alagoas ganha arranjo produtivo de laranja no Vale do Mundaú. Disponível em:<<http://www.investne.com.br/Noticias-Alagoas/Alagoas-ganha-arranjo-produtivo-de-laranja-no-Vale-do-Mundau>>. Acesso em: 16 de out. 2009, 19:54:20.
- JACKMAN, E. A. **Alcohol industrial**. In: BU'LOCK, J., KRISTIANSEN, B. Biotecnologia Básica. Zaragoza: Acribia, 557 p. p. 320-321, 1991.
- JOHANNESSEN, C.J. Pejibaye palm: physical and chemical analysis of the fruit. **Economic Botany**, 1967.
- JOHNSTON, C. S.; BULLER, A. J. Vinegar and peanut products as complementary foods to reduce postprandial glycemia. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 105, n. 12, p. 1939-1942, 2005.
- KLICK Educação. **Enciclopédia viva. Laranja**. 200/2006. Disponível em: <<http://www.klickeducacao.com.br/enciclo/encicloverb/0,5977,POR-8562,00.html>>. Acesso em: 11 abr. 2011, 21:54:50.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.
- KOZIOL, M.J. e PEDERSEN, H.B. *Phytelephas aequatorialis* Spruce (Arecaceae) in human and animal nutrition. **Economic Botany**, 1993.
- LAND, D.G.; SHEPHERD, R. Scaling and ranking methods. In: PIGGOTT, J.R. (Ed.) Sensory analysis of foods. London: **Elsevier Applied Science**, 1988.
- LIMA, U. A.; BASSOS, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. Biotecnologia Industrial: Processos Fementativos e Enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. **Biotecnologia Industrial**. v.3.

- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Produção de ácidos por micro-organismos**. In: Tecnologia das fermentações. São Paulo, 1975. p.74-78.
- LLAGUNO, C., POLO, M.C. El Vinagre de Vino. **Consejo Superior de Investigaciones Científicas**, Madrid, 238 p.66, 1991.
- LOPES, R.V.V.; ROCHA, A.S.; SILVA, F.L.H.; GOUVEIA, J.P.G. Aplicação do planejamento fatorial para otimização do estudo da produção de fermentado do fruto da palma forrageira. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campinas, v .7, n.1, p.25-32, 2005.
- LU, S. F.; LEE, F, L.; CHEN, H. K. A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp. I14-2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 55 62, 1999.
- MADRID, C.; CENZANO,I. VICENTE, J.M. **Manual das indústrias dos alimentos**. Tradução de José A. Ceschin. São Paulo: Livraria Varela, 1996.
- MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. **Avaliação de mosto de uva fermentado** **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**., Campinas, 281-284, abr.-jun. 2007
- MARTINELLI, FILHO, A. **Tecnologia de Vinhos e Vinagres de Frutas**. Piracicaba: Usp. p.130,1982.
- MARQUES, F.P.P.; SPINOSA, W.; FERNANDES, K.F.; CASTRO, C.F.S, CALIARI, M. Características físico-químicas de fermentados acéticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, maio 2010.
- MECCA, F.; ANDREOTTI, R.; VERONELLI, L. **L'aceto: tecnologia industriale e tradizionale emprego nell industria conserveira utilizzazione in cucina**. 1. ed. Brescia, 1979.
- MENDES, J.C.; MARINHO.; S.C.; LOPES, N.A.; FILHO.; J.E.M.; NASCIMENTO, A.R.; FILHO, V.E.M. **Vinho de laranja**. São Luís, v. 12, 2001.
- MENEGUZZO, J.; RIZZON, L. A. **Sistema de produção de vinagre**. Embrapa Uva e Vinagre. 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/ autores.htm>>. Acesso em 07 mar. 2011, 21:12:03.
- MILLER, G. L. Use of denitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428. 1959.
- MOREIRA, R. F. A. Glicídios no Mel. **Química Nova**. v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- MORETTO, E.; ALVES, R.F.; CAMPOS, C.M.T.; ARCHER, T.M.B.; PRUDÊNCIO, A.J. **Vinhos e Vinagres - Processamento e análises**. Florianópolis: Editora da UFSC, p.82-167, 1988.

MORETTO, E.; ALVES, R.F.; ARCHER, P.M.B.; CAMPOS, C.M.T.; PRUDÊNCIO, MUNIZ, C. R. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 309-322, 2002.

MORI, F.A.; MENDES, L.M.; TRUGILHO, P.F.; CARDOSO, M.G. Utilização de eucaliptos e de madeiras nativas no armazenamento da aguardente de cana de açúcar. **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p.396-400, 2003.

MUÑOZ, A.M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation in quality control**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 240 p.

NETTO, G. C. Vinagre brasileiro ainda está distante do padrão de qualidade internacional. **Jornal da Unicamp**. São Paulo. 7 a 13 de agosto de 2006. p. 09.

NORONHA, J. F. **Análise sensorial – Metodologia**. Versão 1,0. Escola Superior Agrária de Coimbra, 2003. Disponível em: [http://www.esac.pt/noronha/A.S/Apontamentos/sebenta\\_v\\_1\\_0.pdf](http://www.esac.pt/noronha/A.S/Apontamentos/sebenta_v_1_0.pdf). Acesso em: 14 de maio 2011, 16:51:26.

OETTERER, M.; REGINATO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2006. 605p.

OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas em destilarias artesanais**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.

ONDER, D.F.D. **Avaliação sensorial de diferentes dosagens de lascas de carvalho adicionadas durante a fermentação malolática em um vinho chardonnay**. Trabalho de Conclusão de Curso, Bento Gonçalves, 2006. Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves.

ONJUS. **100% advantage**. Disponível em: <http://www.onjus.com/advantage.html>> Acesso em 10 de maio 2011, 14:45:06.

PALMA, M. S. A.; CARVALHO, L. F. C. P; GAVÓGLIO, L. C.. Vinagres. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, p. 183-208, 2001.

PEDRÃO, M. R., CORÓ, F. A. G. **Análise sensorial e sua importância na pesquisa de alimentos**. UNOPAR- Universidade Norte do Pará. Científico. Ciências. Biologia. Saúde, Londrina, v. 1, n. 1, p. 85-89, out. 1999. Disponível em: [http://www2.unopar.br/pesq\\_arq/revista/BIOLOGICA/00000276.pdf](http://www2.unopar.br/pesq_arq/revista/BIOLOGICA/00000276.pdf)>. Acesso em: 18 set. 2010.

PEDROSO, P. M. F. **Produção de vinagre de maçã em biorreator airlift**. Dissertação (Mestrado). Florianópolis- SC, 2003. Universidade Federal de Santa Catarina. Acesso em: 07 març.2011, 00:12:21.

- PIRRÔLO, M.P.S. 2006. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado), Rio Claro, São Paulo, 2006. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências.
- PLATTING, K. H. The sense of taste. *In: SENSORY Analysis of Food*. Elsevier **Applied Science**, p.1-23, 1988.
- PLESSI, M.; BERTELLI, F.M. Extraction and indentification by GC-MS of phenolic acids in traditional balsamic vinegar from Modena. **Journal of Food Composition and Analysis**, v;19, p.49-54, 2006.
- PORTAL CARAS. **Laranja Lima**. Edição 750. Editora caras - abril 2011 Disponível em: <<http://www.caras.com.br/edicoes/750/textos/laranja-lima>> Acessado em: 10 abril 2011, 15:23:12.
- QUINÁIA, S. P.; FERREIRA, M. Determinação de Ácido Ascórbico em Fármacos e Sucos de Frutas por Titulação Espectrofotométrica. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9 n. 1, jan/jun 2007.
- RAO, M. R. R.; STOKES, J. L., **Utilization of ethanol by acetic bactéria**. Department of Bacteriology, Indiana University, Bloomington, Indiana, v. 66, p. 634-638, 1953. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/reprint/66/6/634.pdf>> Acesso em 25 abril 2011, 18:21:31.
- REED, J.B.; HENDRIX JR., C.M. e HENDRIX, D.L. **Quality control manual for citrus processing plants**. Safety Harbour: Intercit., v.1, p. 250, 1995.
- REINOLD, M. R. **Manual Prático de Cervejaria**. São Paulo: Aden Editora, 1997. 103p.
- REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A.M.; ADACHI, S.; GIL, R.R.; YANG, H.; BASILE, M.J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, B.; KENNELLY, E.J. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228-1230, 2006.
- Revista época. O vinho se transforma no rei do supermercado Ed.470 de 10 de Nov 2008. Disponível em: :<<http://revistaepoca.globo.com/Revista/Epoca/0,,EMI56989-15228,00-O+VINHO+SE+TRANSFORMA+NO+REI+DO+SUPERMERCADO.html>> Acesso em 10 de jan. 2011, 18:37:11.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A. Características analíticas de vinagres comerciais de vinhos brasileiros. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 1, n. 1.2, p. 25-31, 1998.
- RIZZON, L.A.; ZANUS, M.C.; MANFREDINI, S. **Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade**, 3ªed., Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, p.36, 1994.
- ROCHA, M. C.; SILVA, A. L. B.; ALMEIDA, A.; COLLAD, F. H. Efeito do uso de biofertilizante agrobio sobre as características físico-químicas na pós-colheita do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) no município de Taubaté. **Revista de Biociências**, Taubaté, v. 7, n. 2, p. 7-13, 2001

SACCHETTI, M. Sull. Aceto balsâmico modenense: tecnologia, química, microbiologia e bioquímica. **Bologna: Edagricole**, 1972, p. 75.

SACHS, L. G. **Vinagre**. Bandeirantes: Departamento de Ciências Biológicas e Tecnologia da Fundação Faculdades de Agronomia Luiz Meneghel, 2001. Disponível em: <<http://200.203.137.2/Guilherme/VINAGRE.pdf>>. Acesso em: 11 de março. 2011, 08:45:21.

SALTON, M. A.; DAUDT, C. E.; RIZZON, L. A. Influência do dióxido de enxofre e cultivares de videira na formação de alguns compostos voláteis e na qualidade sensorial do destilado de vinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 302-308, 2000.

SACHS, L.G. **Tecnologia dos produtos agropecuários – Transformações de produtos vegetais**. FFALM - Fundação Faculdades Luiz Meneghel, Bandeirantes, p.58-73, 1990.

SANDHU, D.K.; JOSHI, V.K. Technology, quality and scope of fruit wines especially apple beverages. **Indian Food Industry, New Delhi**, v.14, n.1, p.24-34, 1995.

SANTOS JUNIOR, V. **Estudo das necessidades nutricionais de bactérias acéticas para a produção de ácido acético**. 2009. Tese (Doutorado). Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciência de Alimentos, 2009. Disponível em: <<http://cutter.unicamp.br/document/?code=000439749>>. Acesso em: 07 març. 2011, 21:02:31.

SANTOS, R.C.A., NARAIN, N., ABUD, A. K. S., ARAUJO, A.G.T., ARAUJO, S.M., VIEIRA, G.S., LEAL, A.L.J. **Influência da luz na elaboração da bebida fermentada pelo uso do suco de laranja**. In: 7º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, 2007.

SANTOS, S. C.; ALMEIDA, S. S.; TOLEDO, A. L.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. Elaboração e Análise Sensorial do Fermentado de Acerola (*Malpighia Punicifolia*.L.). **Brazilian Journal of Food Technology**. 5º SIPAL, março, 2005.

SATO, G.S. Importação de Vinhos no Brasil Cresceu 30,7% de 2009 a 2011. Instituto de Economia e Agrícola. Análises e Indicadores do Agronegócio, v. 7, n. 3, 2012. Disponível em: <[www.iea.sp.gov.br](http://www.iea.sp.gov.br)>. Acesso em: 21 de nov. 2011, 21:02:30.

SEGUN, I. Y.; KARAPINAR, M. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). **International Journal of Foods Microbiology**, v. 96, p. 301-305, 2004.

SGS do Brasil Ltda. **Análise sensorial**. When you need to be suge. São Paulo. Disponível em:<<http://www.meuspa.com.br/download/AnaliseSensorial.pdf>> Acesso em 14 de mai. 2011, 12:31:02.

SHAW, P.E.; MOSHONAS, M.G.. **Ascorbic Acid Retention in Orange Juice Stored under Simulated Consumer Home Conditions**. v. 56, n. 3, p. 867-868, 1991.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOKOLLEK, S. J.; HERTEL, C.; HAMMES, W. P. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. Nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 48, p. 935-940, 1998.

SOUZA, M.D.C.A.; **Identificação, quantificação e comparação das substâncias químicas responsáveis pelos aromas da cachaça de alambique e do rum comercial tratados pelo processo de irradiação.** Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices.** 2 ed. San Diego: Academic Press, 1992.

SU, M. S., CHIEN, P.J. Aroma impact components of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) vinegars. **Food Chemistry**. v. 119, p. 923-9281, 2010.

SUGAI, Áurea Y. **Processamento descontínuo de purê de manga (*mangifera indica* Linn.), variedade haden: estudo da viabilidade do produto para pronto consumo.** São Paulo., 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

TAKAOMI, I.; HIROYUKI, S.; HIROYUKI, H.; KAZUYUKI, S.; TAKESHI, K. Efficient acetic acid production by repeated fed-batch fermentation using two fermentors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 295-299, 1991.

TESFAYE, W.; MORALES, M. L.; GARCÍA - PARRILHA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Wine vinegar: Technology, authenticity and quality evaluation. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 13, p. 12-21, 2002.

TORRES NETO, A. B.; SILVA, M. E.; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anarcadium occidentale* L.). **Química Nova**. v.29, n.3, 489-492, 2006.

UFRGS. (2001), Relatório Consolidado. Porto Alegre :UFRGS. Bento Gonçalves: IBRAVIN. **Estudo do Mercado Brasileiro do Vinho, Espumantes e Suco de Uva**, 2001.

UVIBRA - UNIÃO BRASILEIRA DE VITINICULTURA. **Dados estatísticos.** Bento Gonçalves, 2011. Disponível em:<[http://www.uvibra.com.br/dados\\_estatisticos.htm](http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm)>. Acessado em: 28 mar. 2012, 15:45:20.

VASCONCELOS, J. N. de, 1998, **Fermentação etanóica com levedura imobilizada em colmos de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado.** São Paulo: Edgard Blücher, 2005. 364p.

VILELA, P.S. Faemg. **E por falar em frutas**. Belo Horizonte- MG. Disponível em: <http://www.faemg.org.br/Content.aspx?Code=358eParentCode=13eParentPath=None>.> Acesso em :29 jul. 2010, 14:56:02.

XAVIER, L.; REMÉDIOS, M.; MARIA, R.; FONTES, S.; KARINE, S. **Produção de vinagre de maçã**. Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar. POMBAL – PB, 2009. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAT1AAA/producao-vinagre-maca>>. Acesso em: 28 março 2012, 19:21:23, 20:23:23.

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

WATTS, B. M. ; YLIMAKI, G.L.; JEFFERY, L.E.; ELÍAS, L.G. **Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos**. Ottawa: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 1992. p. 170.

ZANCANARO JR., O. **Vinagres**. In: Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. (Ed). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001, v. 4, p. 183-208.

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