



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ESTÊVÃO ZILIOI

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS
NO PROCESSAMENTO DE VINAGRES.**

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**FUMIO YOKOYA
ORIENTADOR**

**WILMA APARECIDA SPINOSA
CO-ORIENTADORA**

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Estêvão Zilioli, aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e orientado pelo Prof. Dr. Fumio Yokoya.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Z64c Zilioli, Estevão, 1980-
Composição química e propriedades funcionais no
processamento de vinagres / Estêvão Zilioli. -- Campinas,
SP: [s.n], 2011.

Orientador: Fumio Yokoya.
Co-orientador: Wilma Aparecida Spinosa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Vinagre. 2. Compostos fenólicos. 3.
Capacidade antioxidante. 4. Compostos voláteis. I.
Fumio Yokoya. II. Spinosa, Wilma Aparecida. IV.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Chemical composition and functional properties in the
processing of vinegar

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Vinegar

Phenolic Compounds

Antioxidant Capacity

Volatile compounds

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Fumio Yokoya [Orientador]

Helena Teixeira Godoy

Hélia Harumi Sato

Raul Jorge Hernan Castro-Gomez

Vitório dos Santos Júnior

Data da defesa: 21/09/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fumio Yokoya
FEA/UNICAMP
Orientador

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
FEA/UNICAMP
Membro Titular

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
FEA/UNICAMP
Membro Titular

Prof. Dr. Raul J.H. Castro-Gomez
DCTA/UEL
Membro Titular

Prof. Dr. Vitório dos Santos Júnior
Unip - FAI
Membro Titular

Profa. Dra. Évelyn de Souza Oliveira Lopes
UFMG
Membro Suplente

Profa. Dra. Patrícia de Miranda Brusantin
Unimar
Membro Suplente

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore
FEA/UNICAMP
Membro Suplente

DEDICATÓRIA

Às mulheres que me ensinaram sobre a vida, sobre o amor e sobre a ciência,
Maria Eugênia, Glaucia e Wilma.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Fumio Yokoya, pela orientação sábia, compreensiva e serena;

À Wilma Spinosa, pela imensa dedicação e cuidado desde a minha iniciação científica. Por todas as orientações, tanto na vida acadêmica quanto pessoal;

À professora Helena Teixeira Godoy e a todos do Laboratório de Análise de Alimentos, pela fundamental ajuda;

À minha família amada, irmãs, cunhados e sobrinhos, que sempre me incentivaram e apoiaram. Especialmente à minha irmã Márcia, colega de profissão e apoiadora deste trabalho;

Ao meu pai, já ausente, mas que em vida soube, à sua maneira, incentivar meus estudos, sem esquecer-se da formação do meu caráter;

Aos meus amados sogros, Antônio e Cleusa, pela dedicação e cuidado, fundamentais em todos os momentos;

Ao Zanchetta e à Clara, que cederam várias horas em família, em benefício desta tese. E pelos momentos em que fizeram com que eu me sentisse parte da família;

Aos professores Évelyn de Souza Oliveira Lopes, Glaucia Maria Pastore, Helena Teixeira Godoy, Hélia Harumi Sato, Patrícia de Miranda Brusantin, Raul J.H. Castro-Gomez e Vitorio dos Santos Júnior, membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões apresentadas ao trabalho;

À professora Marta Benassi, pelo grande auxílio no direcionamento da análise estatística;

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP;

À Empresa Tecnologia em Saúde/Vinagre Dom Spinosa, pela atenção e condições de trabalho sempre acolhedoras;

À Empresa J. Rapacci e, em especial, a Ana Rapacci, Ricardo Llorca e Márcia, pelo auxílio nas análises e pelas informações prestadas;

À Associação Nacional dos Produtores de Vinagre -ANAV, pelas informações prestadas;

Ao Colégio Super Ensino, em especial à diretora administrativa, Maria Olinda de Souza, que mostrou que carinho e profissionalismo podem andar juntos;

Às Faculdades Adamantinenses Integradas, pelo grande apoio e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii	
LISTA DE TABELAS	ix	
LISTA DE TABELAS DO ANEXO.....	x	
RESUMO	xi	
SUMMARY	xiii	
1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... 1	
2	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	Fermentação Acética	5
2.2	As bactérias do ácido acético.....	7
2.3	Métodos de produção de vinagre	8
2.3.1	Processo Lento, Orleans ou Francês	9
2.3.2	Processo rápido ou alemão.....	10
2.3.3	Processo submerso	12
2.4	Compostos secundários de vinagres	13
2.5	Compostos bioativos em vinagres	16
2.6	Matérias-primas para a produção de vinagres	21
2.6.1	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	22
2.6.2	Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	22
2.6.3	Carambola (<i>Averrhoa carambola</i>).....	23
2.6.4	Kiwi (<i>Actinia chinensis</i>)	24
2.6.5	Laranja (<i>Citrus sinensis</i>).....	25
2.6.6	Maçã (<i>Malus</i> sp.)	26
2.6.7	Maracujá (<i>Passiflora edulis</i>).....	27
2.6.8	Mel de <i>Apis mellifera</i>	28
2.6.9	Milho (<i>Zea mays</i>).....	29
2.6.10	Toranja (<i>Citrus paradisi</i>).....	30
2.6.11	Uva (<i>Vitis</i> sp.)	30
3	MATERIAL & MÉTODOS	32
3.1	Micro-organismos	32

3.2	Matérias-primas	32
3.3	Enzimas	33
3.4	Reator de fermentação alcoólica	33
3.5	Gerador de fermentação acética	33
3.6	Aparato de filtração	35
3.7	Obtenção dos vinagres	36
3.7.1	Fermentação alcoólica	36
3.7.2	Fermentação acética	37
3.8	Determinações	38
3.8.1	Acompanhamento dos processos fermentativos	38
3.8.2	Caracterização físico-química dos vinagres produzidos.....	39
3.8.2.1	Grau alcoólico real.....	39
3.8.2.2	Acidez volátil.....	40
3.8.2.3	Cinzas.....	41
3.8.2.4	Extratos secos total e reduzido.....	41
3.8.2.5	Sulfatos	42
3.8.2.6	Açúcares totais	43
3.8.3	Álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas	45
3.8.4	Compostos fenólicos totais	46
3.8.5	Determinação da capacidade antioxidante.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	Rendimentos dos processos de fermentação acética.....	48
4.2	Caracterização dos vinagres produzidos.....	49
4.3	Compostos voláteis	55
4.4	Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico.....	57
4.5	Análises de agrupamento hierárquico e de componentes principais	66
4.6	Ingestão de compostos fenólicos pelo consumo de vinagre	69
5	Conclusões	72
6	Referências Bibliográficas	74
7	ANEXO.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Oxidação do etanol a ácido acético.....	6
Figura 2	Diagrama de um gerador de vinagre.....	11
Figura 3	Diagrama do acetificador rápido.....	34
Figura 4	Esquema do microfiltro de fluxo tangencial.....	36
Figura 5	Diagrama para determinação de sulfatos em vinagres.....	43
Figura 6	Sequestro do radical DPPH nos mostos de frutas e fermentados alcoólicos e acéticos.....	61
Figura 7	Dendrograma obtido da análise de agrupamento hierárquico das onze amostras de vinagre utilizando dezenove variáveis: extrato seco total, extrato seco reduzido, açúcares totais, cinzas, grau alcoólico total, acidez volátil, acidez total, cloretos, dióxido de enxofre, pH, sequestro do radical DPPH, fenóis totais, acetaldeído, acetato de etila, metanol, diacetil, acetato de butila, isobutanol, hexanol.	66
Figura 8	Gráfico de scores dos vinagres produzidos, usando os dois componentes principais (CP1 <i>versus</i> CP2).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros obtidos no processo de obtenção dos vinagres	48
Tabela 2	Resultados das análises de caracterização dos vinagres produzidos, utilizando os métodos analíticos oficiais.	50
Tabela 3	Resultados das análises de caracterização dos vinagres produzidos, utilizando os métodos analíticos oficiais	53
Tabela 4	Resultados dos teores dos compostos voláteis (mg/L) pesquisados nos vinagres produzidos e estatísticas básicas.....	55
Tabela 5	Média, desvio padrão e coeficiente de variação da porcentagem de sequestro do radical DPPH, do sequestro equivalente ao ácido gálico (EAG) e dos compostos fenólicos totais das amostras analisadas	58
Tabela 6	Média, desvio padrão e coeficiente de variação da porcentagem de sequestro do radical DPPH, do sequestro equivalente ao ácido gálico e dos compostos fenólicos totais dos vinagres padronizados para consumo	69

LISTA DE TABELAS DO ANEXO

Tabela A1	Descrição dos pesos das componentes principais 1 (CP 1) e componentes principais 2 (CP 2) para as variáveis estudadas.....	84
Tabela A2	Descrição dos pesos das componentes principais 1 (CP 1) e componentes principais 2 (CP 2) para as amostras de vinagre analisadas.....	84

RESUMO

Os vinagres de frutas popularizam-se cada vez mais no planeta, sendo produzidos a partir de diversos cultivares ou de seus resíduos, com o uso de técnicas clássicas ou modernas. Esses produtos apresentam grande variedade de ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, compostos fenólicos e outros elementos com importantes funções fisiológicas. O vinagre de maior qualidade depende mais dos seus compostos secundários do que do ácido acético, embora a realidade brasileira aponte situação diversa: a cultura geral não preza pela qualidade dos vinagres consumidos, o que determina os baixos preços do produto no mercado, pois além de matérias-primas pouco nobres, os processos acabam por priorizar tão somente o ácido acético. O objetivo desta pesquisa foi estudar a agregação de compostos de valor sensorial e funcional em vinagres produzidos a partir de diferentes matérias-primas. Os vinagres estudados foram os de arroz, cana, milho, mel, carambola, kiwi, laranja, maçã, maracujá, toranja e uva. Os vinagres de arroz, milho e cana foram preparados a partir de destilados etanólicos e cachaça. Os mostos de frutas foram obtidos por maceração ou despulpamento, adicionando-se o preparado enzimático Pectinex® Ultra SPL em quantidade suficiente e o teor de açúcar foi corrigido com sacarose para atingir 18-20° Brix. Na sequência, efetuou-se a fermentação alcoólica, utilizando a levedura liofilizada *Saccharomyces cerevisiae* “Y904”. A partir do vinho obtido, procedeu-se a fermentação acética rápida e determinou-se as seguintes características dos vinagres: a) acidez total; b) acidez volátil; c) acidez fixa; d) pH; e) extrato seco; f) minerais; g) açúcares totais; h) grau alcoólico; i) metanol; j) dióxido de enxofre; k) sulfato; l) cloreto total; m) compostos voláteis (acetaldeído, acetato de etila, metanol, diacetil, acetato de butila, isobutanol, hexanol, octanol); n) capacidade antioxidante (% de sequestro do Radical DPPH) e conteúdo fenólico (Folin-Ciocalteu). Os vinagres produzidos encontraram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação e adequados aos parâmetros preconizados na literatura científica. Houve grande variação nos teores de compostos voláteis dos produtos, sendo o acetato de etila o único presente em todas as amostras. Os fermentados acéticos de destilados etanólicos apresentaram valores menores de compostos fenólicos totais e de sequestro do DPPH quando comparados com os produzidos a partir das frutas, no entanto, tais compostos estavam ausentes nas matérias-primas utilizadas (cachaça, etanol de arroz e etanol de milho). Na produção de vinagres de frutas, a composição de cada

cultivar mostrou ter grande influência no conteúdo fenólico e na capacidade antioxidante dos fermentados alcoólicos e dos vinagres. O mosto, o fermentado alcoólico e o vinagre de uva apresentaram os valores mais altos de sequestro relativo do radical DPPH em comparação com as outras amostras, apesar de não possuírem os maiores teores de compostos fenólicos. Porém, quando os vinagres foram diluídos para atingirem 4% (p/v) em acidez total, o produzido a partir de toranja superou os demais no que se refere às características funcionais estudadas. A partir de estatística multivariada em relação aos resultados de dezenove variáveis foi possível separar os vinagres produzidos em quatro grupos: (1) os feitos com matérias-primas destiladas (arroz, milho e cachaça), (2) o produzido com mel, (3) o fermentado da uva e (4) os obtidos a partir de carambola, kiwi, laranja, maçã, maracujá e toranja.

SUMARY

The fruit vinegars increasingly become popular on the planet, being produced from various crops or their residues, using classical and modern techniques. These products have great variety of organic acids, vitamins, minerals, phenolic compounds and other elements with important physiological functions. Vinegar higher quality depends more on their secondary compounds than acetic acid, although the Brazilian reality shows another situation: the general culture does not value the quality of vinegar consumed, which determines the low prices of the product on the market, as well as ignoble raw materials, processes end up as only prioritize the acetic acid. The objective of this research is to study the aggregation of sensory and functional compounds in vinegars produced from different raw materials. The vinegars studied were produced from rice, sugarcane, corn, honey, starfruit, kiwi, orange, apple, passion fruit, grapefruit and grapes. The vinegars of rice, corn and sugar cane were derived from ethanol and “cachaça”. The musts were obtained by macerating fruit, adding sufficient quantity of enzyme preparation with correction of sugar contents by the use of saccharose. Then we performed the alcoholic fermentation using yeast lyophilized "Y904". From the resulting wine, was proceeded to acetic fermentation by German method and determined the following characteristics: a) total acidity, b) volatile acidity; c) fixed acidity; d) pH; e) dry stratum f) minerals g) total sugars; h) alcohol content; i) methanol; j) sulfur dioxide; k) sulfate; l) total chloride m) volatile compounds (acetaldehyde, ethyl acetate, methanol, diacetyl, butyl acetate, isobutanol , hexanol), n) phenolic content (Folin-Ciocalteu) and antioxidant capacity (DPPH radical scavenging). The vinegars were in accordance with standards established by law and appropriate to the parameters recommended in the scientific literature. There was wide variation in levels of volatile compounds and ethyl acetate was the only one present in all samples. In vinegars made with distilled raw materials, lower values were observed for total phenolic compounds and DPPH radical scavenging compared with those produced from fruit, however, these compounds were absent in the raw materials used (cachaça, ethanol from rice and ethanol from corn). In the production of fruit vinegars, the composition of each cultivar have great influence on the phenolic content and antioxidant capacity of wines and vinegars. Juice, wine and vinegar produced from grapes showed the highest values of DPPH radical

scavenging in comparison with other samples, despite not having the highest levels of phenolic compounds. But when the vinegars was diluted to reach 4% (w / v) total acidity, the product from grapefruit topped the other with regard to functional characteristics studied. The vinegars produced were separated into four groups by multivariate analysis: (1) those made with distilled raw materials (rice, corn and cachaça), (2) the vinegar made from honey, (3) grape vinegar and (4) obtained from the star fruit, kiwi, orange, apple, passion fruit and grapefruit.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O vinagre, dependendo de sua matéria-prima, apresenta diferentes composições, nutrientes e sabores. Além do vinho, obtido a partir de uva, dão origem ao vinagre outras frutas, como a laranja, limão, maçã, pêra, figo, ameixa, caqui, abacaxi, pêssego, banana, amora, melancia, mexerica, jabuticaba, caju, morango e uvaia. Podem sofrer fermentação acética para produção de vinagre matérias-primas ricas em amido, como batata, batata-doce e mandioca, que produzem os chamados vinagres de tubérculos amiláceos. Há também vinagres obtidos de materiais açucarados, como mel, melaços, xaropes de açúcar, glicose, ou vinagres de álcool, de efluentes da fabricação de leveduras e de aguardentes em geral. Têm-se ainda os vinagres obtidos a partir de cereais como a cevada (vinagre de cerveja), centeio, trigo, milho e arroz (LAI et al., 1980, ADAMS, 1985, MORETTO et al., 1988 apud SPINOSA, 2002).

Embora a fermentação acética possa ser um processo espontâneo, quando partes de vinho entram em contato com o ar, o vinagre está longe de ser uma simples deterioração do vinho. Do ponto de vista industrial, o processo deve ser bem controlado para se obter um alto grau de acidez no menor tempo possível. Espécies de *Acetobacter* são os micro-organismos envolvidos nesse processo e é claro que todos os fatores que confirmam melhores condições de crescimento para esta bactéria irão aumentar a produção e velocidade de acetificação (TESFAYE et al., 2004).

Como condimento, o vinagre é usado em certos alimentos apenas com a finalidade de conferir gosto ácido, como nas saladas e maioneses. Em outros alimentos, além de conferir sabor e odor, o vinagre atua como conservante e agente de amaciamento, como acontece nas carnes temperadas e legumes em conserva. Nos últimos anos, a importância do vinagre como produto alimentício tem crescido (NATARA et al., 2003).

O vinagre de vinho é um produto enológico que consegue, dependendo do tipo de produção, personalidade distinta, geradora de alto grau de apreciação entre os consumidores. Um vinagre de qualidade depende muito mais de seus componentes

secundários do que do ácido acético. Os compostos de importância sensorial possuem, na maioria dos casos, um limiar de detecção (*threshold*) muito baixo e pequenas alterações no processo de produção podem ser fundamentais para a aceitação ou não do produto pelos consumidores (KASHIMA et al. 2000, PALACIOS et al., 2002, TESFAYE et al., 2004).

No Brasil, a cultura geral não preza pela qualidade dos vinagres consumidos, algo que determina os baixos preços do produto no mercado. A falta de gosto por vinagres com maior qualidade pode ser explicada pela falta de conhecimento técnico do processo de fabricação pelos produtores ou pelo uso de matérias-primas pouco nobres, além da pouca divulgação do produto, com seus possíveis usos e aplicações. O consumo de vinagres de frutas é muito pequeno, sendo a principal matéria-prima o etanol de cana. Em países como a Espanha, o consumo de vinagres chamados especiais tem crescido em comparação com outros vinagres comerciais, cujo mercado apresenta-se estacionado. Buscam-se cada vez mais produtos com valor agregado maior, com melhores atributos sensoriais e capacidade funcional comprovada (GARCÍA-PARRILLA et al., 1997, SPINOSA, 2002, BELLINI, 2006).

Segundo dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do biênio 2008-2009, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o consumo per capita de vinagre no Brasil gira em torno de 0,55 L, sendo 45,5% de vinagre de álcool, 20,2% de vinagre de vinho e 34,3% dos demais, que englobam os vinagres mistos e produzidos com outras matérias-primas. A região que mais consome vinagre de álcool é a nordeste, onde 68,8% do vinagre consumido pertencem a essa categoria. A população que mais consome vinagre de vinho é a do sudeste, já que 28,8% dos produtos vendidos são desta categoria. Em números absolutos, o sul consome mais vinagre de vinho (0,21 L ou 21,6%), já que a região tem o maior consumo per capita, cerca de 1 litro por ano. O centro-oeste brasileiro é onde menos se consumo vinagre (0,35 L per capita) e os produtos mais consumidos pertencem à categoria “não especificado”, que exclui os fermentados acéticos de álcool e vinho (IBGE, 2010).

A Associação Nacional dos Vinagreiros - ANAV, localizada em Jundiaí, município paulista responsável por 80% da produção do vinagre nacional, congrega 24 indústrias de vinagre espalhadas por todo país. O consumo per capita do brasileiro, segundo a associação é de 0,8 L por ano. Esse número difere dos dados do IBGE, pois os dados da associação consideram o consumo indireto de vinagre (na forma de molhos, conservas e outros produtos). As indústrias associadas à ANAV produziram em 2009, 170 milhões de litros vinagre, com um faturamento de 200 milhões de reais, ou 0,01% do Produto Interno Bruto deste ano.

Os vinagres de frutas tornam-se cada vez mais populares em todo o mundo. Estes podem ser produzidos de diversos cultivares e também de seus resíduos, usando técnicas clássicas e modernas. Assim como suas matérias-primas, estes vinagres apresentam grande variedade de ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, compostos fenólicos e vários outros compostos com importantes funções fisiológicas (DÁVALOS; BARTOLOMÉ; GOMÉZ-CORDOVÉS, 2004, LIU; HE; WANG, 2008, CEREZO et al., 2010).

As propriedades biológicas dos vinagres, especialmente os de frutas, são o tema de algumas pesquisas nos últimos anos, em busca de aprofundamento sobre o assunto, ainda que o produto tenha usos medicinais há séculos. Redução da aterosclerose e efeito antitumoral são os principais benefícios atribuídos ao vinagre, ambos relacionados à presença de compostos fenólicos (NISHIDAI et al., 2000, SHIMOJI et al, 2002, MIYAKAMA et al., 2003).

A maioria dos trabalhos realizados até hoje sobre composição de vinagres traz informações apenas sobre o produto acabado ou sobre alguma etapa de seu processamento. Faltam estudos sobre a composição de vinagres de uma maneira ampla, desde a matéria-prima até o produto final, considerando todas as etapas de produção.

O presente trabalho pretende preencher algumas destas lacunas, ao longo de todo o processo de fabricação de vinagres a partir de diversas matérias-primas. O acompanhamento do conteúdo fenólico e da capacidade antioxidante na matéria-prima e nos fermentados alcoólico e acético permitirá um maior entendimento sobre a influência das etapas na formação ou degradação destes.

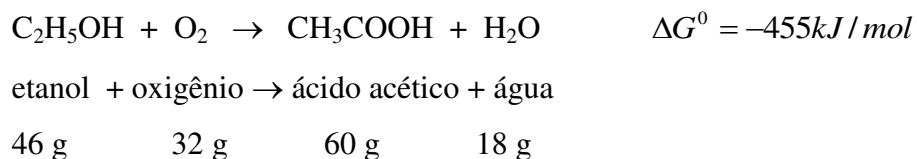
Foi estudado também o teor de compostos de importância sensorial e os padrões de identidade dos vinagres produzidos a partir de arroz (*Oryza sativa*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), milho (*Zea mays*), mel de *Apis mellifera*, carambola (*Averrhoa carambola*), kiwi (*Actinia chinensis*), laranja (*Citrus sinensis*), maçã (*Malus domestica*), maracujá (*Passiflora edulis*), toranja (*Citrus paradisi*) e uva (*Vitis* sp.). Os vinagres foram agrupados hierarquicamente por meio de análise estatística multivariada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fermentação Acética

Em microbiologia industrial, o termo *fermentação* se refere a qualquer processo microbiano em grande escala, seja ele ou não bioquimicamente uma fermentação. De fato, a maioria das fermentações industriais é aeróbica. O tanque em que ocorre a fermentação é chamado de fermentador e o micro-organismo utilizado é o agente de fermentação (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A fermentação acética refere-se a um processo envolvendo a oxidação do etanol e formação de ácido acético consumo de O₂, ocorrendo liberação de grandes quantidades de energia. A oxidação segue de acordo com a equação básica:



Embora o ácido acético possa ser facilmente produzido a partir do álcool por métodos químicos, o produto microbiano (vinagre) corresponde a um composto diferenciado, sendo parte do seu sabor resultante da presença de outras substâncias encontradas no material inicial, e outra parte, resultante daquelas produzidas durante a fermentação. Por essa razão, o processo microbiano nunca foi suplantado pelo processo químico (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A Figura 1 apresenta o esquema de oxidação do etanol a ácido acético (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

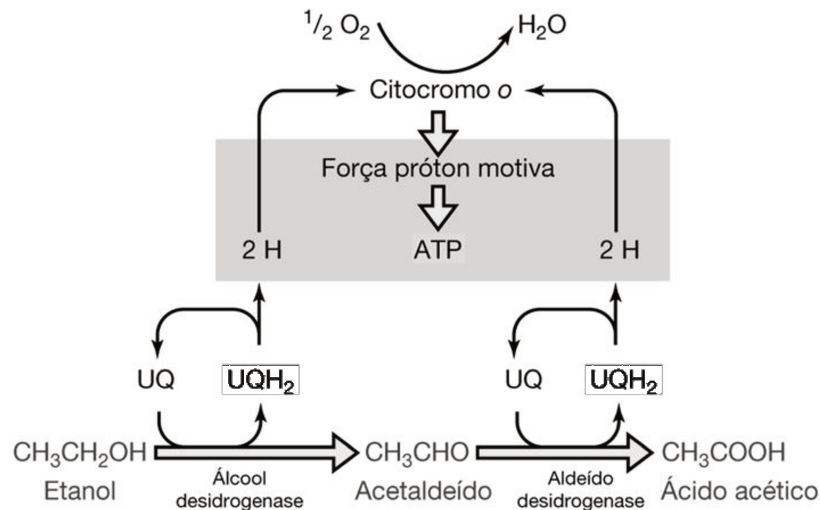


Figura 1. Oxidação do etanol a ácido acético

Fonte: MADIGAN; MARTINKO; PARKER (2004)

O etanol é oxidado por duas reações sequenciais, catalisadas por enzimas ligadas à membrana, a álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). As duas enzimas são ligadas ao exterior da membrana periplasmática e catalisam reações de oxidação por estarem localizadas no espaço periplásmico. Tais reações de oxidação são chamadas "fermentação oxidativa", uma vez que envolvem oxidação incompleta do álcool acompanhada pelo acúmulo do produto de oxidação correspondente em grande quantidade no meio de crescimento. Estudos recentes demonstraram que os aceptores intermediários de elétrons do processo não são NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo), mas ubiquinonas (UQ) que também são usadas na diferenciação das espécies de *Acetobacter* e *Gluconobacter* (EBNER et al., 1996, SAEKI et al., 1997, LU; LEE; CHEN, 1999, MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Recentemente, outro grupo de enzimas ADH e ALDH foi encontrado no citoplasma de *Acetobacter*, sendo chamadas de ADH e ALDH dependentes de NAD(P). Essas enzimas parecem estar mais envolvidas com a assimilação do etanol nos ciclos dos ácidos tricarboxílicos e do glioxilato, sendo as enzimas da membrana – independentes de NAD(P) – as responsáveis pela produção de ácido acético (CHINNAWIROTPISAN et al., 2003).

A evaporação de compostos voláteis durante a fermentação acética é uma das principais causas da redução no rendimento da concentração (Y) em escala industrial. A perda por evaporação de etanol na indústria chega a ser de 10 a 30% do rendimento estequiométrico, dependendo da temperatura de trabalho. As quantidades de ácido acético evaporado durante o processo de fermentação são mínimas em comparação aos teores presentes na fase líquida, porém, a perda de etanol devido à evaporação resulta em prejuízo econômico. Em estudo de modelagem matemática do equilíbrio líquido-gás na fermentação acética em sistema aberto, semiaberto e fechado, concluiu-se que esse último é mais apropriado para indústria, pois apresenta menor perda por evaporação (ROMERO; CANTERO, 1998 apud SPINOSA, 2002).

2.2 As bactérias do ácido acético

As bactérias do ácido acético são gram-negativas ou gram-variáveis, aeróbias, não formadoras de esporos e apresentam-se na forma de bastonetes elipsoidais que podem ocorrer sozinhos, em pares ou em cadeias. Seus tamanhos variam entre 0,4-1 μm de largura e 0,8-4,5 μm de comprimento. São catalase positiva e oxidase negativa. O pH ótimo para seu crescimento é de 5 a 6,5, podendo crescer em valores de pH entre 3 e 4. Podem apresentar flagelos polares ou peritríquios. Até recentemente, eram classificadas em dois gêneros: *Acetobacter* e *Gluconobacter*, porém atualmente outros dez gêneros pertencentes anteriormente à família Alphaproteobacteria foram acomodados na família Acetobacteraceae: *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Acidomonas*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia* e *Ameyamaea*, sendo as oito últimas de ocorrência bastante rara em vinagres, vinhos e frutas (YAMADA; YUKPHAN, 2008).

As principais representantes das bactérias acéticas pertencem ao gênero *Acetobacter* e são usadas desde os primórdios para a produção do vinagre por fermentação (BILSKA et al., 2003).

As bactérias do gênero *Acetobacter* podem ser encontradas em flores, frutas, mel, saquê, tequila, vinho de palma, grapa, cidra, cerveja, kefir, cerveja Bantu sul-africana, leveduras fermentadas, vinagre, aparas de madeira usadas em acetador de produção de vinagre pelo processo rápido, acetificadores de vinagre, 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. A bactéria acética é usada na fabricação de vinagre e é deteriorante em cervejas e vinhos (DE LEY et al., 1984, HOLT et al., 1994, SWINGS, 1992 apud SPINOSA 2002).

Para hidrolisar açúcares, *Acetobacter* faz a rota metabólica da hexose monofosfato e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. A glicólise está ausente ou fracamente executada, assim como a fosfofrutoquinase também está ausente. O ciclo de Entner-Doudoroff parece ocorrer somente nas linhagens de *Acetobacter* que sintetizam celulose, formalmente classificadas como *A. aceti* subsp. *xylinum*. Nestas, o citado ciclo é mais ativo do que o ciclo da hexose monofosfato. Linhagens capazes de crescer em meio Hoyer com etanol como única fonte de carbono e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como única fonte de nitrogênio utilizam enzimas da rota secundária do glicoxilato. *Acetobacter*, assim como *Gluconobacter*, têm notável capacidade oxidativa de açúcares, álcoois e esteróides (ASAI, 1968, DE LEY et al., 1984).

Pouco se sabe sobre a influência da linhagem de *Acetobater* na composição dos vinagres, já que na prática industrial são usadas apenas culturas mistas. Alguns estudos demonstram, no entanto, que além do ácido acético, outros metabólitos de importância no vinagre, como os ésteres, são também produzidos por esses micro-organismos, por meio de esterases intracelulares (KASHIMA et al., 1998, KASHIMA et al. 2000).

2.3 Métodos de produção de vinagre

Existem três principais processos de conversão microbiológica de uma solução diluída de etanol em vinagre.

2.3.1 Processo Lento, Orleans ou Francês

É o processo mais antigo, observado a partir do avinagramento do vinho colocado em barricas semi-cheias. Com o tempo, modificações passaram a ser feitas, com o objetivo de acetificar mais rapidamente e em maior quantidade o processo fermentativo. Percebeu-se a relação entre área e volume no processo. Desta forma, barricas deitadas passaram a receber vinho ou cidra em quantidade inferior à capacidade dos recipientes, melhorando a relação de área-volume. Orifícios foram feitos nos recipientes, protegidos de insetos, facilitando e aumentando a circulação de ar. Tábuas foram utilizadas na superfície do mosto e, posteriormente, acrescentou-se um quadriculado com ripa de madeira apropriada, para sustentar as bactérias oxidativas, juntamente com o polímero α -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 posicionar-se 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 colocado 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 (AQUARONE; ZANCANARO, 1990, ZANCANARO, 1988, MORETTO et al., 1988, SPINOSA, 1996, SPINOSA, 2002).

O vinagre produzido por este método tem qualidade considerada superior à do obtido por outros métodos, isto porque ocorre o amadurecimento natural no vinagre, antes de sua retirada. Esse amadurecimento reduz o sabor picante, próprio dos vinagres recém produzidos, tornando o líquido mais suave e, conseqüentemente, mais agradável (ZANCANARO, 1988, SPINOSA, 1996).

O envelhecimento permite a lentidão das transformações químicas, transformando resíduos de acetaldeído, etanol, ácido acético e outros, produzindo ésteres e hemi-acetais, de sabores e odores mais agradáveis. Tem-se também um mascaramento da

acidez em função do efeito tampão, devido às proteínas, aminoácidos e sais minerais (AQUARONE, ZANCANARO, 1990, SPINOSA, 1996).

2.3.2 Processo rápido ou alemão

Também chamado de *Schützenback* ou *Boerhave*, este método surgiu na Alemanha, no início do século XIX, tornando-se até meados do século XX o principal processo para a produção industrial de vinagre. Originou-se a partir da observação da importância da aeração no processo lento (MORETTO et al., 1988, SPINOSA, 1996).

O sistema de produção por meio de gerador é talvez o mais comum, em se falando do processo rápido. O gerador, sob a forma de um tanque cilíndrico, apresenta três partes: a seção superior; seção maior (a do meio), que é preenchida com aparas de madeira, sabugos de milho ou outro material propício à formação de grande área de exposição; e seção inferior (MORETTO et al., 1988, SPINOSA, 1996).

No processo de avinagramento, a solução etanólica é colocada na parte superior por meio de um alimentador ou por dispositivo borrifador. O líquido passa à parte central, por meio de gotejamento, onde ocorrerá a oxidação do álcool a ácido acético. O líquido depara-se com filme de bactérias acéticas, desenvolvido no material de suporte. Da parte central, mais uma vez por gotejamento, o líquido passa à parte inferior, já como vinagre, de onde é coletado (MORETTO et al., 1988, SPINOSA, 1996).

O ar entra no gerador por meio de orifícios situados no fundo falso da seção mediana. Esquentando, esse ar sobe e é aspirado por cima. Uma vez que o processo de oxidação libera calor em quantidade considerável, há necessidade de controle de temperatura, para que ela não supere o limite de 30°C. Isso é conseguido por meio de serpentinas resfriadoras, pelo ajustamento do fluxo de ar e da entrada do líquido acetificado, e por resfriamento da matéria-prima antes da sua introdução no gerador. Outra possibilidade é a refrigeração do líquido parcialmente acetificado, que retorna do fundo para o topo do gerador, para acetificação complementar (MORETTO et al., 1988).

A Figura 2 apresenta um diagrama de um gerador de vinagre (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

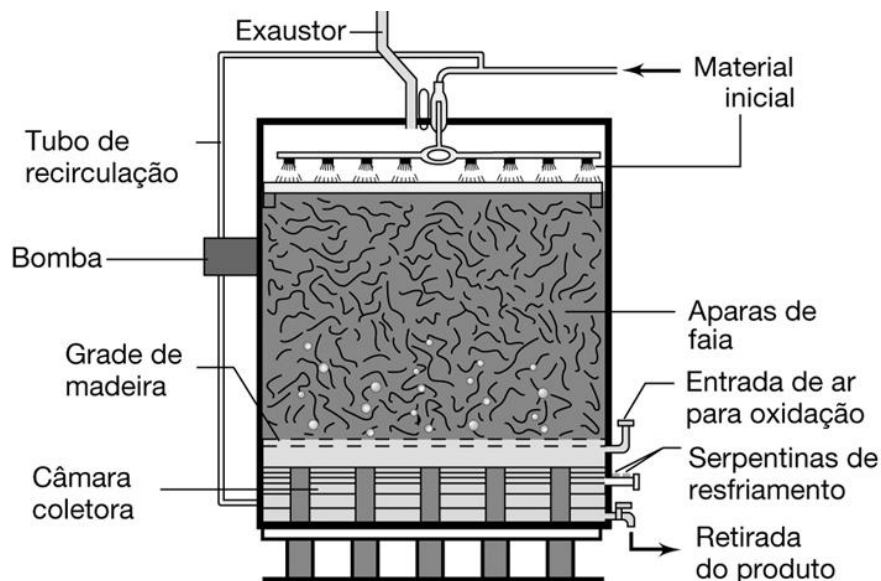


Figura 2. Diagrama de um gerador de vinagre

Fonte: MADIGAN; MARTINKO; PARKER (2004)

O processo alemão apresenta inconvenientes. Está sujeito a gravíssimas infestações por insetos e moscas, como a *Drosophyla melanogaster*, ou por nematóides, como a *Anguilulla aceti*. Isso acaba forçando a desativação total do recipiente, obrigando o produtor a esterilizar todo o meio de enchimento, por vapor ou assepsia com etanol. É também freqüente o entupimento total dos locais de passagem do mosto e do ar, em virtude do crescimento incontrolável de bactérias acéticas indesejáveis (*Acetobacter xilynum*), produzindo excessiva quantidade de zoogléia sobre a superfície do material. Neste caso, existe a necessidade de substituição anual de todo o material. O processo depende ainda de potentes bombas ácido-resistentes, de cuidados para se evitar ressecamento da madeira, entre outros. Exige-se também a utilização de enormes galpões. As dificuldades para a manutenção de tal processo fazem com que ele só esteja ainda em uso graças ao alto custo para se efetuar mudança de tecnologia (ZANCANARO, 1988, SPINOSA, 1996).

2.3.3 Processo submerso

Na produção de vinagre por este processo, as bactérias acéticas encontram-se submersas no mosto, multiplicando-se e retirando energia da reação de oxidação do álcool etílico a ácido acético. Para catalisar essa reação, que lhes fornece energia, as bactérias acéticas necessitam da administração contínua e adequada de oxigênio em todos os pontos do tanque. Interrupções breves, de minutos apenas, no fornecimento de oxigênio, sobretudo nas fases finais de fermentação, afetam quase que definitivamente o rendimento (FRINGS..., 1996; SPINOSA, 1996).

O equipamento mais utilizado para a produção de vinagre em cultura submersa é conhecido como Acetador *Frings*, patenteado por Heinrich Frings, a partir de conclusões desenvolvidas por Otto Hromatka e Heinrich Ebner, em 1949, quando estes trabalhavam na referida empresa.

A matéria-prima diluída e corrigida em seus nutrientes é colocada no fermentador e inoculada com vinagre forte ou com uma suspensão de bactérias acéticas. O equipamento é automatizado, contendo um alcóografo responsável pelo registro contínuo do teor alcoólico do meio e também pelo descarregamento automático do vinagre pronto. O produto final contém ainda com cerca de 0,2% de álcool, tendo em vista que o consumo total deste último prejudica as bactérias acéticas e pode provocar deterioração no vinagre acabado. Imediatamente após a retirada do vinagre, há recarregamento com matéria-prima, utilizando-se como inóculo parte do volume de vinagre feito anteriormente e deixado no tanque. A partir daí, a cada 24 horas, um volume de vinagre correspondente a 1/3 do valor total do tanque é retirado, obtendo-se aumento de acidez da ordem de 4% ao dia (AQUARONE; ZANCANARO, 1990, SPINOSA, 1996).

O acetador destaca-se pela produtividade, muito superior aos demais processos e, portanto, adequado aos moldes industriais modernos. Entretanto, seus inconvenientes estão no alto custo de investimento inicial; na necessidade de técnicos especializados para a manutenção; e na obrigatoriedade de constância de produção, pois pequenas interrupções

na aeração levam ao recomeço do processo, o que pode levar meses. Há também a necessidade de infraestrutura completa. O vinagre produzido entre 24 e 30 horas por tal processo mostra-se turvo, requerendo tratamentos de filtração para obter-se limpidez adequada (ZANCANARO, 1988, SPINOSA, 1996).

2.4 Compostos secundários de vinagres

Além do ácido acético, uma série de compostos é encontrada no vinagre. Alguns desses compostos já estão presentes na matéria-prima, outros são agregados durante os dois processos fermentativos e ainda outros no processo de maturação ou envelhecimento.

Um tipo mais complexo de produtos industriais é aquele em que o produto desejado não é obtido na primeira fase de crescimento e sim na fase estacionária. Os metabólitos produzidos durante a fase estacionária se denominam metabólitos secundários e são alguns dos metabólitos mais comuns e de maior interesse industrial. Ao contrário do metabolismo primário que é geralmente similar em todas as células o metabolismo secundário apresenta claras diferenças entre um organismo e outro. No metabolismo secundário, a produção em questão pode não se derivar do substrato primário do crescimento, mas a partir de um produto formado. Portanto, o metabólito secundário se produz, geralmente, a partir de vários produtos intermediários que se acumulam, ou no meio de cultivo ou nas células durante o metabolismo primário. Uma característica dos metabólitos secundários é que as enzimas implicadas na produção do metabólito secundário são reguladas separadamente das enzimas do metabolismo primário (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

O sabor e o aroma dos vinagres de vinho são determinados pelos constituintes formados durante os dois processos de fermentação (alcoólica e acética), sendo que a maturação e envelhecimento também têm papéis importantes. Para melhorar a qualidade aromática do vinagre e apresentar novos produtos aos consumidores, fabricantes devem utilizar matérias-primas de boa qualidade. Embora a maioria dos compostos voláteis já

esteja presente no vinho, a composição dos vinagres de vinho é diretamente relacionada às características genuínas do vinagre em si. Estes compostos têm um efeito decisivo nas características sensoriais do vinagre e em sua qualidade (CHARLES et al., 2000, TRONCOSO et al., 1987 apud MORALES et al., 2002).

Os ésteres, como acetato de etila, também são produzidos durante a fermentação acética, já que *Acetobacter* apresenta esterases intracelulares. A formação de ésteres em *Acetobacter* é diferente do que ocorre em leveduras, em que o processo é catalisado pela enzima álcool acetiltransferase, com álcool e acetil CoA como substratos. Essa atividade não é detectada em *Acetobacter*. Quando etanol é oxidado a ácido acético, ambos, etanol e ácido acético estão presentes no meio em altas concentrações, o que possibilitaria o processo de esterificação, catalisado por esterases intracelulares. A formação do éster através de uma esterase é possível em *Acetobacter* sp. porque este micro-organismo é capaz de crescer em altas concentrações de etanol e ácido acético (KASHIMA et al., 1998, KASHIMA et al. 2000).

Charles e colaboradores (2000) realizaram um estudo sobre os compostos voláteis responsáveis pelo aroma de dois tipos de vinagres de vinho tinto. Identificaram por cromatografia gasosa/olfatometria 8 compostos percebidos por pelo menos 70% dos provadores: ácido acético, ácido 3-metilbutírico, 2-fenil-1-etanol, 2,3-butanodiona, ácido butírico, ácido 2-metilbutírico, mistura de 2 - e 3-metil-1-butanol, e dois novos compostos identificados no vinagre, 3-hidroxi-2-pentanona e 3 - (metiltio)-1-propanal. Estes compostos eram provenientes tanto do processo de acetificação quanto do vinho usado como matéria prima na produção dos vinagres.

Os três grupos de compostos mais importantes no aroma de vinagres são ácidos, álcoois e ésteres. Entre os ácidos, além do acético, outros apresentam importância no aroma e são frequentemente identificados por olfatometria. No trabalho de Charles e colaboradores (2000) os ácidos 2-metilpropanóico, butírico e 3-metilbutírico foram descritos sensorialmente como queijo e notas de ranço. O ácido 2-propanóico foi descrito como frutado em concentrações abaixo de 100mg/L e acima desta faixa era reconhecido

como queijo. Alguns desses ácidos estão presentes no vinho e outros podem ser formados pela oxidação de álcoois como 1-propanol e 2-butanol. Dentre os álcoois identificados, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol apresentaram descrições semelhantes (alvejante), mas diferentes limiares de detecção. Outros três álcoois foram identificados pelos provadores: 2-metil-1-propanol, como notas de chocolate, 3-(metiltio)-1-propanol, caracterizado como pão seco ou batata e 4-etilguaicol com picante e notas de coco. No vinagre, a maioria dos ésteres é resultado da fermentação do álcool, ou pela reação de ácidos e álcoois durante o envelhecimento. Esses compostos são muitas vezes descritos como aromas frutados e notas florais. O acetato de etila é o éster mais importante em vinagres e é resultante do processo de acetificação, sendo relacionado com odor de abacaxi ou mesmo com “odor ácido de vinagre”.

Em seu estudo sobre os compostos voláteis de vinagres balsâmicos tradicionais da região de Modena, na Itália, Del Signore (2000) elencou os seguintes compostos como os mais importantes no aroma desses vinagres: acetaldeído, acetato de metila, acetato de etila, acetato de isopropila, etanol, 2-propanol, 2,5-dimetilfurano, acetato de propila, diacetil, acetato de isobutila, 1-propanol, acetato de butila, hexanal, álcool isobutílico, acetato de isoamila, heptanal, álcool isoamílico, hexanol, ácido propiônico, octanol e diacetato de 2,3-butanodiol. Com a pesquisa desses componentes foi possível distinguir diversas amostras de vinagres “comuns” e balsâmicos, criando uma espécie de impressão digital desses produtos.

Na produção de vinagres a partir de novas matérias primas, a determinação de compostos voláteis importantes no aroma global do produto é uma etapa preliminar significativa (CHARLES et al., 2000). A avaliação sensorial é uma das técnicas utilizadas para a determinação de compostos voláteis, no entanto, a técnica se mostra limitada para vinagres devido à pungência de ácido acético. Assim, o uso de técnicas cromatográficas apresenta resultados mais seguros na diferenciação dos produtos (SU; CHIEN, 2010).

2.5 Compostos bioativos em vinagres

Diversos estudos têm demonstrado que os radicais livres presentes no organismo humano causam dano oxidativo a diversas moléculas, tais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e, portanto, estão envolvidos com o desenvolvimento de algumas doenças degenerativas. Como consequência, compostos capazes de sequestrar os radicais livres podem desempenhar um papel importante na prevenção de certas doenças, como câncer, catarata, patologias cerebrais e de artrite reumatóide (BORS et al., 1990, CLIFFORD, 1995, HERTOOG et al. 1995 apud GARCÍA-ALONSO et al., 2004).

Estes radicais causam alterações nas células, agindo diretamente sobre alguns componentes celulares, como ácidos graxos poliinsaturados das membranas, proteínas celulares e ácidos nucleicos. Neste último caso, pode gerar mudanças em moléculas de DNA. A produção de radicais livres é uma consequência fisiológica de diversos processos metabólicos no organismo, sendo também secundária a uma série de injúrias exógenas como bactérias e outros organismos. Suas fontes endógenas e exógenas são, principalmente, luz ultravioleta, raios X, interação com metais de transição (ferro e cobre), metabolismo de fármacos, metabolismo aeróbio e presença de doenças com resposta inflamatória. Qualquer condição clínica que envolva isquemia e reperfusão, como, por exemplo, choque seguido de ressuscitação, liberação de obstrução intestinal, transplante de órgãos e revascularização de membros isquemiados também estão relacionados com o aumento da produção de radicais livres (GALIZIA, 2001, SOARES, 2002, BEATTIE, 2003).

As moléculas conhecidas como antioxidantes são capazes de prevenir ou inibir a degradação induzida pelas reações dos radicais livres, minimizando os danos do estresse oxidativo. Esses compostos são comumente classificados em antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, sendo os últimos representados, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathiona-redutase e glutathiona-peroxidase, que fazem parte dos

sistemas de detoxificação das espécies reativas de oxigênio das células aeróbias (MORELLO; SHAHIDI; HO, 2002, BONNEFOY et al., 2002 apud BORELLA; VARELLA, 2004).

Os antioxidantes não enzimáticos são pequenas moléculas e constituintes protéicos que também viabilizam a proteção celular e do plasma contra radicais livres. Ácido ascórbico, retinol e tocoferol (vitaminas C, A e E, respectivamente), ácido úrico e algumas proteínas (ceruloplasmina, albumina, transferrina, haptoglobina e hemopexina) constituem os principais antioxidantes não enzimáticos. Além destes, os compostos fenólicos existentes em diversas matérias-primas de origem vegetal têm apresentado importante ação contra o estresse oxidativo e no curso natural de doenças crônicas, merecendo crescente interesse de pesquisas científicas (MARTÍNEZ-CAYUELA, 1995, ARAUJO, 2001, THOMAS, 2003).

Uma das principais reações relacionadas com a função dos antioxidantes é a abstração do hidrogênio. Nesta reação, o antioxidante é a fonte do hidrogênio que será abstraído, ou seja, ele doa o átomo de hidrogênio ao radical livre, removendo a região reativa da molécula, tornando-a mais estável. Desta forma, esses compostos inibem a propagação de reações em cadeia que formariam novos radicais livres. Os principais antioxidantes capazes de doar hidrogênio aos radicais livres são os fenóis e polifenóis, tióis, ácido úrico, ácido ascórbico e carotenoides, entre outros (MORELLO; SHAHIDI; HO, 2002).

Os compostos fenólicos totais englobam substâncias como tocoferóis, fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas, considerados os maiores responsáveis pela atividade antioxidante em frutos, por sua grande capacidade reativa. No grupo dos flavonóides encontram-se principalmente as antocianinas, flavonas e flavonóis. Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos: ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e cumarinas. Dentre os compostos fenólicos com propriedade antioxidante

destacam-se as antocianinas e os flavonóides, pigmentos amplamente difundidos no reino vegetal e que conferem as várias nuances de cores aos alimentos (SOARES, 2002).

O consumo de polifenóis na dieta tem sido associado a uma redução no risco de doenças degenerativas, especialmente às relacionadas com a oxidação de lipídeos séricos, como a aterosclerose. Mais recentemente, novas linhas de pesquisa tem explorado a capacidade dos polifenóis de interagir na expressão e ativação de genes relacionados com respostas inflamatórias e proliferativas. Os mecanismos que levam esses compostos a afetarem o controle da expressão desses genes são praticamente desconhecidos, levando a uma união de esforços na comunidade científica para o melhor entendimento dos efeitos benéficos dos polifenóis na saúde humana (VIRGILI; SCACCINI, 2001).

Na carcinogênese, após uma mutação gênica, diversas proteínas novas são sintetizadas e muitas formarão radicais livres – portanto o poder antioxidante de muitas substâncias irá prevenir esses processos. Daí a importância da pesquisa com modelos *in vitro*, na tentativa de minimizar os problemas ocasionados em diversas doenças (OLIVEIRA et. al, 2010).

Os produtos de reação de Maillard, como as melanoidinas e o hidroximetilfurfural são formados durante o processo de fabricação e armazenamento de vinagres, especialmente o vinagre balsâmico. A reação, que envolve um aldeído (açúcar redutor) e grupos amina de aminoácidos e proteínas, seguida de várias etapas que culminam com a formação do pigmento escuro, é a principal causa do escurecimento desenvolvido durante o aquecimento e armazenamento prolongados do produto. A elevação da temperatura resulta no aumento rápido da velocidade de escurecimento, afetando a composição do pigmento formado e a intensidade do mesmo. Vinagres que passam por processos de cocção e envelhecimento apresentam elevadas concentrações de produtos de reação de Maillard, relacionados com a alta capacidade antioxidante desses produtos e provável prevenção do dano oxidativo. Nesses casos, a atividade antioxidante das amostras

não se correlaciona com seu conteúdo fenólico (ARAÚJO, 2006, VERZELLONI; TAGLIAZUCCHIB; CONTE, 2007, XU; TAO; AO, 2007).

A capacidade funcional dos vinagres tem sido relacionada com uma série de compostos com atividade biológica, especialmente os antioxidantes, compostos que possuem uma grande habilidade de seqüestrar radicais livres. A maioria dos antioxidantes dos vinagres provém de sua matéria-prima, com a vantagem de, neste produto, estarem no estado solúvel e, portanto, mais biodisponíveis que nas frutas e vegetais *in natura* (MARTÍNEZ-CAYUELA, 1995, ARUOMOA, 1998, ALONSO et al., 2004, BELLINI, 2006, XU; TAO; AO, 2007).

A presença de compostos fenólicos no vinho tinto e no vinagre apresenta efeitos positivos para a saúde, pois estes produtos mantêm uma boa parcela dos compostos fenólicos presentes nas uvas, expressando uma capacidade antioxidante significativa. Os compostos fenólicos mais abundantes no vinho tinto são os ácidos fenólicos e flavonóides. Os vinagres de vinho também são ricos em polifenóis, apresentando benefícios potenciais para a saúde, tais como o efeito anti-hipertensivo observado em ratos (DÁVALOS; BARTOLOMÉ; GÓMEZ-CORDOVÉS, 2005, VERZELLONI; TAGLIAZUCCHIB; CONTE, 2007).

A relação entre as propriedades antioxidantes e o conteúdo fenólico e de flavonóides de vinagres produzidos na Itália foi estudada por Verzelloni, Tagliazucchib e Conte (2007). O teor de flavonóides e de polifenóis teve alta correlação com a capacidade antioxidante no vinagre de vinho tinto estudado, enquanto que nos vinagres balsâmicos essa correlação foi menor. Os autores sugerem que a presença de produtos da reação de *Maillard*, como o hidroximetilfurfural, pode explicar essa baixa correlação, uma vez que estes contribuem na atividade antioxidante das amostras, sem serem detectados na metodologia de Folin-Ciocalteu, usada para a quantificação de compostos fenólicos.

Andlauer, Stumpf e Fürst (2000) avaliaram o conteúdo fenólico de vinhos tinto, branco e de maçã e compararam com os perfis fenólicos de seus vinagres correspondentes. Foi verificada uma significativa redução no teor de fenóis totais pelo processo de acetificação, especialmente no vinagre de maçã. Apesar da variação no conteúdo total de fenóis, a diminuição no conteúdo de cada um dos compostos fenólicos estudados só foi verificada no vinagre de vinho tinto. Os autores reconheceram a escassez de trabalhos que relatem a influência da acetificação na composição fenólica de vinagres.

Dávalos, Bartolomé e Gómez-Cordovés (2005) analisaram as propriedades antioxidantes de sucos de uva e vinagres por meio da determinação da capacidade de sequestro de radical oxigênio em ensaio usando fluoresceína como sonda fluorescente. As diferenças nas atividades das amostras foram atribuídas aos seus diferentes teores de compostos fenólicos e outros antioxidantes não fenólicos. Apesar das diferenças, concluíram que o suco de uva e o vinagre de vinho são boas fontes nutricionais de antioxidantes.

Shimoji e colaboradores (2002) analisaram a atividade antioxidante do *Kurosu*, vinagre de arroz integral, e demonstraram que os compostos fenólicos presentes no produto possuíam atividade antitumoral. Os principais compostos estudados foram os ácidos dihidroxiferúlico, dihidroxisinápico, ferúlico, sinápico, vanílico, e *p*-hidroxicinâmico, sendo que os dois primeiros foram os que mais contribuíram na inibição de tumores. O *Kurosu* apresentou efeitos semelhantes em trabalho anterior, realizado por Nishidai e colaboradores (2000), quando testes *in vitro* e em pele de camundongos mostraram o efeito antitumoral do produto. As propriedades antioxidantes e de sequestro e interferência na formação de radicais livres foram as explicações encontradas para esse efeito.

Yamaji e colaboradores (2001) sugeriram que a introdução do *Kurosu* na dieta poderia reduzir o perigo de aterosclerose. Os autores confirmaram a atividade de sequestro de radicais livres em *Kurosu* pela redução do DPPH (Difenil-1-Picrilhidrazil) e o efeito antioxidante sobre as lipoproteínas de baixa densidade humana (LDL).

O consumo dos polifenóis presentes no vinho tem mostrado uma série de benefícios à saúde, especialmente na prevenção da aterosclerose, mesmo em indivíduos com uma dieta rica em colesterol, fato reportado como o “Paradoxo Francês”. Estudos epidemiológicos demonstraram que a população francesa tem menor mortalidade por doença coronariana comparada com outros países, a despeito de sua dieta rica em colesterol, o que deu origem a tal expressão (RENAUD; LORGERIL, 1992 apud IJIMA; YOSHIKUMI; OUCHI, 2002).

O “Paradoxo Francês” pode ser explicado por alguns fatos: os polifenóis do vinho inibiram a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em estudos realizados *in vivo* e *in vitro* (Anonymous, 1993 apud IJIMA; YOSHIKUMI; OUCHI, 2002); os mesmos compostos mostraram efeitos como redução dos níveis de lipoproteínas e aumento dos níveis de colesterol-HDL, além de vários outros efeitos antiaterogênicos (STEPHAN et al., 1999 apud IJIMA; YOSHIKUMI; OUCHI, 2002).

2.6 Matérias-primas para a produção de vinagres

Qualquer fonte de carboidrato fermentescível pode ser usada na fabricação de vinagre. Ao redor do mundo, diversas matérias-primas têm sido usadas, sendo o vinho (uvas) considerado o mais tradicional. Também são considerados vinagres tradicionais os vinagres feitos a partir de sidra (maçãs), saquê (arroz) e cerveja (malte), porém diversas fontes não tradicionais têm sido citadas na literatura científica, como laranja, mel, manga, banana, abacaxi, amora, caju, tamarindo, kiwi, maracujá, jabuticaba e cebola. No Brasil a imensa maioria dos vinagres produzidos tem com matéria-prima o etanol de cana-de-açúcar e nos Estados Unidos o vinagre de etanol de cereais, especialmente o de milho é produzido em larga escala (MALDONADO; ROLZ; CABRERA, 1975, SPINOSA 1996, HORIUCHI; KANNO; KOBAYASHI, 1999, NATERA et al. 2003, BOFFO et al., 2009).

2.6.1 Arroz (*Oryza sativa*)

O arroz é alimento consumido por quase metade da população mundial e produzido em mais de cem países. Nos últimos anos, a qualidade nutricional do arroz tem recebido mais atenção nos países em desenvolvimento, onde o consumo quase exclusivo de arroz pode levar a deficiências de minerais essenciais, vitaminas e outros compostos nutricionais. Este fato não é causado pela falta de nutrientes do arroz em si, mas pelo fato do produto ser tradicionalmente consumido após beneficiamento, processo que envolve a retirada do farelo, que é rico em proteínas, fibras, óleos, minerais, vitaminas e outros fitoquímicos (BOUIS et al., 2003, SHEN et al., 2009).

Diversos estudos têm sido realizados no Japão sobre o *Kurosu*, vinagre feito com arroz integral, demonstrando que o produto possui grande atividade antioxidante, especialmente pelo seu conteúdo fenólico. Estes estudos sugerem efeito antitumoral e redução do risco de aterosclerose, ambos atribuídos à capacidade de sequestro de radicais livres e interferência na geração de novos radicais (NISHIDAI et al., 2000, YAMAJI et al., 2001, SHIMOJI et al., 2002).

2.6.2 Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*)

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene pertencente ao gênero *Saccharum*, da família Poaceae (Gramineae). É uma cultura que produz, em curto período, um alto rendimento de matéria verde, energia e fibras, sendo considerada uma das plantas com maior eficiência fotossintética. Seu plantio em larga escala é tradicional em vários países das regiões tropical e subtropical para a produção de açúcar, álcool e outros subprodutos (ENRIQUEZ-OBREGÓN et al. 1998 apud LIMA et al., 2001a).

Além de uma fonte importante de sacarose, a cana-de-açúcar e seus derivados apresentam uma série de outros compostos, muitos deles com atividade antioxidante comprovada, como flavonóides e compostos fenólicos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

A cachaça é uma bebida destilada feita a partir da cana de açúcar. Tem um teor alcoólico entre 38 e 48% (v/v). A bebida é obtida pela destilação do mosto fermentado de cana de açúcar e tem características sensoriais singulares. Cachaça é a bebida mais tradicional e segunda mais consumida no Brasil, com uma média de 11 litros consumidos por pessoa por ano e produção anual estimada em 1,3 bilhões de litros, tanto em usinas de grande porte quanto em alambiques tradicionais, onde a fermentação é espontânea e caracterizada por uma complexa comunidade microbiana com uma predominância de *Saccharomyces cerevisiae* (MORAIS et al., 1997, GUERRA et al., 2001).

A cana-de-açúcar é a principal matéria prima para a produção de vinagre no Brasil, devido à sua abundância e ao seu baixo custo. O produto obtido é considerado pobre do ponto de vista sensorial, devido a ser quase que uma solução de ácido acético e água, uma vez que, para sua produção, é utilizado o etanol com concentrações próximas a 100%, posteriormente diluído em água (AQUARONE e ZANCANARO, 1990).

Mimura e colaboradores (2004) realizaram um estudo com Kibizu, um vinagre de cana-de-açúcar produzido em Amami Ohshima, no Japão. A fração extraída com uma solução aquosa de 40% de metanol apresentou alto potencial de sequestro do radical DPPH, além de supressão do crescimento de células de leucemia humana (HL-60). Estes resultados levaram os autores a considerar que os componentes ativos em caldo de cana poderiam ser convertidos em compostos mais lipofílicos pelas fermentações alcoólica e acética, com atividade para induzir a apoptose em HL-60.

2.6.3 Carambola (*Averrhoa carambola*)

A caramboleira (*Averrhoa carambola*), pertencente à família Oxalidaceae, é uma planta tropical originária da Ásia, com frutos considerados exóticos devido ao seu sabor e ao formato de estrela da fruta quando cortada transversalmente. A carambola é um fruto climatérico, sendo comuns as mudanças de cor e nos teores de ácidos e sólidos solúveis após a colheita. O principal ácido identificado na carambola foi o oxálico, cujo

teor é maior na fruta madura e menor nas frutas do tipo doce (NAGY; BARROS; CARTER, 1990 apud PRATI; NOGUEIRA; DIAS, 2002).

Além da fruta fresca, a carambola pode ser consumida na forma de sucos, geléias, compotas, doces caseiros e em saladas. Suas flores também são usadas em saladas e pratos exóticos e o sumo das sementes é utilizado para remover manchas. Suas folhas fazem parte da farmacopéia indiana e seu suco é utilizado como febrífugo, antiescorbútico e antidiarreico (BASTOS, 2004).

A produtividade da caramboleira varia entre 15 e 45 t/ha, podendo chegar a 60 t/ha, dependendo da idade da planta, manejo e intensidade de desbaste. O ponto de colheita ideal da carambola ocorre quando 25 a 75% de sua superfície se encontra amarelada. Plantas provenientes de sementes iniciam a frutificação a partir do 3º ano, enquanto as plantas enxertadas começam a produzir a partir do 2º ano, alcançando a escala de produção comercial a partir do 5º ano, e mantendo-se produtiva por até 20 anos (BASTOS, 2004).

A carambola tem sido considerada uma boa fonte de compostos antioxidantes naturais, sendo capaz de sequestrar radicais livres. Além do ácido ascórbico, os carotenoides e os compostos fenólicos como a epicatequina, o ácido gálico e as proantocianidinas são considerados os principais responsáveis por essa atividade (SHUI; LEONG, 2003).

2.6.4 Kiwi (*Actinia chinensis*)

O kiwi, também conhecido como quiuí ou quivi em algumas regiões brasileiras, é um fruto, pertencente à família Actinidiaceae, de polpa esverdeada e casca castanho a castanho-amarelada coberta de tricomas, de formato oval (5 a 8 cm de comprimento e 4.5 a 5.5 cm de diâmetro) e originado nas regiões montanhosas da China (MORTON, 1987).

Sua utilização industrial tem importância cada vez maior, pela disponibilidade das frutas de maneira diversa durante todo o ano, e pelo aproveitamento daquelas que

apresentam defeitos (cerca de 10-15% da produção anual), sem qualidade para consumo *in natura*. A principal utilização do kiwi é o consumo na forma de fruta fresca ou de sucos naturais, porém pode ser utilizado de várias formas como conserva enlatada, polpa seca (passas), iogurtes, sorvetes, sobremesas, geléias, bebidas alcoólicas fermentadas ou destiladas, amaciantes de carnes, entre outras (NUCCI, 1996).

Por ser rico em vitamina C, o kiwi possui propriedades antiescorbúticas e digestivas (estimulante do apetite e laxativo). O kiwi é usado tradicionalmente na medicina chinesa para o tratamento de câncer de mama e estômago. A boa combinação entre as vitaminas A e E existentes no kiwi pode diminuir o risco de doenças cancerosas e circulatórias, incluindo as coronárias, e melhorar o desempenho do sistema imunológico. A fruta ainda apresenta outras vantagens como a presença de nutrientes essenciais para o organismo como fosfato e magnésio (NUCCI, 1996).

2.6.5 Laranja (*Citrus sinensis*)

A laranja (*Citrus sinensis*), pertencente à família Rutaceae, é originária da Ásia e é uma das principais frutas produzidas no mundo. O Brasil encontra-se entre os principais produtores da fruta, sendo responsável por aproximadamente 80% de todo o suco de laranja concentrado congelado exportado no mundo, sendo os principais consumidores o mercado europeu e o americano, que importam 54% e 34%, respectivamente (SILVA; JARDINE; MATTA, 1998, SELLI et al., 2008).

Ácidos orgânicos, açúcares e compostos fenólicos estão entre os principais constituintes das frutas cítricas. Sua natureza e concentração interferem diretamente no sabor característico e qualidade sensorial. Os principais ácidos orgânicos de frutas cítricas são os ácidos cítrico e málico. Além disso, traços dos ácidos benzóico, oxálico e succínico também foram relatados. Compostos como ésteres, aldeídos, cetonas, terpenos e álcoois também têm grande importância (NISPEROS-CARRIEDO e SHAW, 1990, KELEBEK et al., 2009). O teor de voláteis de suco de laranja pode ser alterado a partir da fermentação alcoólica, devido à produção de novos compostos pelo metabolismo das leveduras, como

álcoois, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas e ésteres, sendo estes últimos de particular importância (SELLI et al., 2008).

Nos últimos anos foi dada uma atenção especial aos compostos fenólicos das frutas cítricas, pois há fortes indícios de que estes possam desempenhar um importante papel na capacidade antioxidante destas frutas. As flavonas e os ácidos fenólicos são os principais compostos fenólicos do suco de laranja, com destaque para a hesperidina, que têm mostrado uma grande variedade de propriedades terapêuticas, como atividades anti-inflamatória, anti-hipertensiva, diurética, analgésica e hipolipidêmica (ATURKI; BRANDI; SINIBALDI, 2004, MONTFORTE; TROVATO; KIRJAVAINEN, 1995 apud KELEBEK et al., 2009)

2.6.6 Maçã (*Malus* sp.)

Maçãs são frutas conhecidas e difundidas do gênero *Malus*, pertencente à família Rosaceae, originária da Ásia Central e considerada a fruta mais antiga a ser cultivada pelo homem.

Em diversas dietas as maçãs representam uma significativa fonte de compostos polifenólicos biodisponíveis, tais como flavonóides, diidrochalconas, antocianidinas e ácidos *p*-hidroxicinâmico e *p*-hidroxibenzóico. Os teores de compostos fenólicos variam muito entre as diferentes variedades de maçãs e mesmo entre as partes do fruto (ESCARPA e GONZALEZ, 1998, ĆETKOVIĆ et al., 2008).

Em estudo realizado no Japão, Abe e colaboradores (2007) estudaram os componentes bioativos do “Okezukuri Ringosu”, um tradicional vinagre japonês, produzido com maçãs esmagadas. Os pesquisadores descobriram e caracterizaram uma molécula com atividade antitumoral em experimentos com camundongos, que foi chamada de NM α G. Esta molécula foi encontrada somente após o processo de fermentação acética ocorrido em fermentados alcoólicos de maçã. O fermentado acético produzido a partir do suco de maçã acrescido de etanol não apresentou a molécula estudada.

Em estudo sobre a redução do perfil lipídico em ratos, Shishehbor e colaboradores (2008) alimentaram ratos *Wistar* machos, normais e com diabetes induzido com ração contendo 6% de vinagre de maçã. Nos ratos normais houve redução significativa dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e aumento significativo de lipoproteína de alta densidade (HDL). O vinagre de maçã também reduziu o nível sérico de triglicérides e aumentou o HDL em ratos diabéticos, sugerindo que o produto pode ser usado no controle de complicações causadas pelo diabetes.

O uso do vinagre de maçã como auxiliar no tratamento do diabetes em humanos, no entanto, é controverso. Hlebowicz e colaboradores (2007) demonstraram que o vinagre afetou pacientes com diabetes *mellitus* insulino-dependentes com gastroparesia diabética, condição em que o esvaziamento do conteúdo gástrico está gravemente prejudicado, mas não há obstrução. Os indivíduos que consumiram 200 mL de água com 30 mL de vinagre por dia antes de um pequeno almoço tiveram suas taxas de esvaziamento gástrico reduzidas ainda mais, o que pode ser uma desvantagem em relação ao seu controle glicêmico.

2.6.7 Maracujá (*Passiflora edulis*)

O Gênero *Passiflora* possui cerca de 500 espécies e é o principal representante da família Passifloraceae. Cerca de 150 espécies são nativas do Brasil, das quais 60 produzem frutos que podem ser aproveitados direta ou indiretamente como alimento. A polpa do fruto, de cor amarela à laranja, envolve sementes numerosas, ovais e pretas. O suco do fruto pode apresentar acidez elevada (maracujá amarelo), média (maracujá roxo) ou baixa (maracujá doce). O suco de maracujá é rico em vitaminas e possui propriedades sedativas (CHAN, 1993, DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

No Brasil, o maior produtor mundial de maracujá, a preferência pelo maracujá amarelo é evidente nos Estados onde é cultivado. Segundo dados do IBGE (2009), a produção entre 2003 e 2007 foi em média de quinhentas e quarenta e sete mil toneladas.

Dentre as regiões produtoras, enquanto a região Nordeste dobrou a produção nos últimos quatro anos, a região Sudeste apresentou ligeira queda.

Os principais fitoconstituíntes do gênero são alcalóides, fenóis, flavonóides e compostos glicosil cianogênicos. A maioria dos trabalhos sobre o gênero são sobre *Passiflora incarnata* e *Passiflora edulis*, tendo as outras espécies apenas relatos esporádicos (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

2.6.8 Mel de *Apis mellifera*

O mel é uma solução supersaturada de açúcares, dos quais a frutose e a glicose são os principais contribuintes. Uma ampla gama de componentes menores também está presente no mel, muitos dos quais são conhecidos por terem propriedades antioxidantes. A composição do mel é bastante variável e depende, principalmente, da origem floral, no entanto, certos fatores externos também desempenham papéis importantes, como fatores sazonais, ambientais e de processamento (GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002).

O mel de abelhas é considerado como parte da medicina tradicional, junto com outros produtos apícolas, como própolis e geléia real. Nos últimos anos o interesse na composição e nas propriedades biológicas do mel tem se renovado, não apenas por sua atividade antimicrobiana, bastante documentada, como por seu conteúdo de polifenóis. Tanto mel quanto própolis contêm mais de 150 compostos fenólicos, incluindo flavonóides e derivados do ácido cinâmico (AL-MAMARY; AL-MEERI; AI-HABORI, 2002 e BURATTI; BENEDETTI; COSIO, 2007)

Em estudo publicado em 2002, Gheldof, Wang e Engeseth relataram que a capacidade antioxidante do mel pareceu ser um resultado da atividade conjunta de uma vasta gama de compostos fenólicos, incluindo, peptídeos, ácidos orgânicos, enzimas, produtos de reação de *Maillard*, e possivelmente outros componentes de menor importância. Os compostos fenólicos contribuíram significativamente para a capacidade antioxidante do mel, mas não foram os únicos responsáveis por isso.

2.6.9 Milho (*Zea mays*)

O milho (*Zea mays*) é um dos cereais mais importantes em todo o mundo. É uma gramínea de elevado potencial produtivo e um cereal de alta qualidade nutritiva. Tem significativa área cultivada no Brasil, que ocupa a terceira posição no ranking mundial de área colhida, destinado tanto para consumo humano como animal (SANTOS, 2002).

O grão de milho é classificado botanicamente como uma cariopse. Apresenta basicamente três partes: o pericarpo, endosperma e o embrião. O pericarpo, a camada fina e resistente que constitui a parede externa da semente, é rica em fibra. O endosperma, a parte mais volumosa do grão, é envolvido pelo pericarpo e constituído de substância de reserva, basicamente o amido. A porção mais externa do endosperma e em contato com o pericarpo denomina-se camada de aleurona, rica em proteínas e enzimas que desempenham papel importante no processo de germinação. O embrião encontra-se ao lado do endosperma, parcialmente envolvido por ele. A composição dos produtos derivados do milho, portanto, depende de quais partes do grão estes produtos incluem (FANCELLI; DOURADO NETO, 1999).

Nos Estados Unidos da América, o milho é a principal matéria prima para produção de etanol, sendo o vinagre de milho também bastante comum. Na China, o milho se encontra entre as principais matérias-primas para a produção de vinagre. O custo da produção de etanol de milho é consideravelmente superior ao de cana-de-açúcar, uma vez que os carboidratos deste estão primariamente na forma de amido, sendo necessária uma hidrólise prévia para iniciar o processo de fermentação alcoólica, etapa desnecessária na produção de etanol de cana. No entanto, ambos os fermentados passam por destilação para obtenção de graus alcoólicos próximos a 100%, o que faz com que os vinagres feitos a partir destes produtos tenham teores mínimos de compostos secundários (AQUARONE e ZANCANARO, 1990, HAMMES et al., 2005, LIU et. al, 2008)

2.6.10 Toranja (*Citrus paradisi*)

A toranja, mais conhecida como *grapefruit* é uma fruta cítrica, pertencente à família Rutaceae. É o quarto grupo comercial mais importante entre as espécies de *Citrus* comestíveis. Consiste de um pequeno número de cultivares que variam em importância, devido às exigências do mercado, condições de cultivo e zonas climáticas. A polpa pode ser branca, rosa ou vermelha, havendo preferência pela última, por seus menores níveis de acidez (DAVIES; ALBRIGO, 1999).

A toranja é uma excelente fonte de nutrientes e fitoquímicos, capazes de contribuir para uma dieta saudável. É uma boa fonte de ácidos orgânicos, açúcares e compostos fenólicos. Sua natureza e concentração em grande parte pode afetar a qualidade e o sabor característico dos frutos (ROUSEFF e MARTIN, 1985 apud KELEBEK, 2009). Os ácidos orgânicos são um índice de autenticidade do produto de fruta. A composição de ácidos orgânicos de frutas também é de interesse devido à sua importante influência sobre as propriedades sensoriais dos sucos de frutas. Os principais ácidos orgânicos da toranja são os ácidos cítrico e málico (KALE; ADSULE, 1995, KARADENIZ, 2004 apud KELEBEK, 2009). Os açúcares são os principais sólidos solúveis de sucos de frutas cítricas e a doçura de sumo de toranja é diretamente relacionada à sua composição de açúcares, sendo a sacarose o principal representante (ROUSEFF; MARTIN, 1985 apud KELEBEK, 2009). Nos últimos anos, mais atenção foi dada aos compostos fenólicos da fruta e algumas publicações têm sugerido que eles possam desempenhar um papel importante na capacidade antioxidante do suco de toranja (MAJO et al., 2005). Os ácidos fenólicos e as flavanonas são os dois principais grupos de compostos fenólicos em sucos de frutas cítricas (RAPISARDA et al., 1999).

2.6.11 Uva (*Vitis* sp.)

A uva é o fruto da videira (*Vitis* sp.), uma planta da família Vitaceae, originária da Ásia e uma das frutas mais antigas utilizadas na alimentação humana. Entre as frutas e hortaliças consumidas, as uvas e seus produtos processados, incluindo suco, vinho, uvas

passas e vinagre são importantes fonte de polifenóis, associados à proteção das lipoproteínas plasmáticas da oxidação (NUNES et al. 2004).

Sabe-se que as características nutricionais da uva são afetadas por fatores culturais do ambiente e de condições pós-colheita, mas o genótipo é o fator principal para determinar a variação (PRIOR et al., 1998, CONNOR et al., 2002, PROTEGGENTE et al., 2002 apud XU et al., 2010). As uvas de origem europeia são cultivadas no mundo todo e seus compostos fenólicos e atividades anti-radicais têm sido bem estudados, havendo poucos estudos dedicados a uvas de outras regiões (XU et al., 2010).

O uso de carvalho para melhorar a qualidade de vinhos é conhecido. Da mesma forma a produção tradicional de vinagres de vinho usualmente envolve o uso de barris de madeira. Bons exemplos são vinagres de vinho “*Sherry*”, na Espanha e “*Aceto Balsamico di Modena*”, na Itália, que são altamente apreciados pelo consumidor e podem alcançar preços elevados (TESFAYE et.al, 2004).

Os vinagres *Sherry* são fabricados na região de Jerez, no sul da Espanha, seguindo um sistema tradicional de envelhecimento conhecido como “*soleras e criaderas*”, no qual os barris de carvalho americano contendo vinagre são empilhados, colocando os mais antigos embaixo (*soleras*) e os mais jovens em cima (*criaderas*). Em seu estudo sobre o poder antioxidante de aguardentes e vinagres de Jerez, Alonso e colaboradores (2004) verificaram que o vinho usado como matéria-prima dos vinagres contribuiu mais para o conteúdo fenólico do que o contato com a madeira durante as operações de envelhecimento.

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Para a condução da fermentação alcoólica, foram utilizadas células de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* Y-904, adquiridas junto à empresa AB Brasil, empresa do grupo britânico Associated British Foods (ABF).

Na etapa de fermentação acética, foi usada uma cultura mista de bactérias acéticas, obtida junto a uma unidade produtora de vinagre.

3.2 Matérias-primas

Foram utilizadas onze matérias-primas para a produção de vinho e vinagre: arroz (*Oryza sativa*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), milho (*Zea mays*), mel de *Apis mellifera*, carambola (*Averrhoa carambola*), kiwi (*Actinia chinensis*), laranja (*Citrus sinensis*), maçã (*Malus domestica*), maracujá (*Passiflora edulis*), toranja (*Citrus paradisi*) e uva (*Vitis* sp.)

Os vinagres de arroz e milho foram obtidos a partir de destilados etanólicos destas matérias-primas, com concentração acima de 96°GL. Estes foram adquiridos de empresa localizada em um município do Estado de São Paulo.

O vinagre de cana-de-açúcar foi preparado a partir de cachaça (40° GL) adquirido de agroindústria produtora de cachaça do Estado de São Paulo.

O vinagre de uva foi preparado com polpa integral, adquirida de unidade processadora de fruta do Estado de São Paulo.

O kiwi utilizado é da variedade Bruno, produzido no Estado de Santa Catarina.

O vinagre de laranja foi preparado a partir da polpa concentrada da fruta, da variedade Hamlin, fornecida por empresa paulista de processamento de frutas cítricas.

A maçã utilizada foi da variedade Catarina, produzida na região de São Joaquim, no Estado de Santa Catarina.

O maracujá utilizado foi do tipo amarelo ou azedo, vindo da região da Alta Paulista, município de Adamantina.

O vinagre de toranja foi obtido a partir da fruta cultivada na região de Itápolis, no interior do Estado de São Paulo.

O mel utilizado no preparo dos fermentados alcoólico e acético foi fornecido por entreposto apícola, situado no município de Içara – SC.

3.3 Enzimas

Para o preparo dos mostos de uva, maçã, laranja, maracujá, toranja e kiwi foi utilizado o preparado enzimático Pectinex® Ultra SPL (Novozymes), com atividades de pectinase, celulase e hemicelulase.

3.4 Reator de Fermentação Alcoólica

O processo de fermentação alcoólica foi realizado em reator com corpo de aço inoxidável escovado AISI 304, com 1,5 mm de espessura, fundo cônico, encamisado e com capacidade de 400L.

3.5 Gerador de Fermentação Acética

O fermentado alcoólico foi convertido em vinagre pelo processo rápido, também conhecido como alemão. O material de construção do acetificador é polipropileno.

Suas dimensões geométricas são: altura de 340 cm, diâmetro 85 cm e volume total de 300 litros. Dispõe de um condensador que atua como resfriador para manter a temperatura de operação na faixa de 30 a 34° C. A Figura 3 mostra o diagrama do acetificador usado nos experimentos.

Apresenta uma coluna preenchida com cerca de 500 kg de bambu (*Bambusa* sp.), que servem de suporte para imobilização das bactérias acéticas. O bambu foi cortado em pedaços de aproximadamente 4 cm de comprimento por 4 cm de diâmetro e acondicionado em 10 sacos com trama larga, de polipropileno (sacos de ráfia).

O líquido recircula dentro do reator por bombeamento. A parte superior possui um dispositivo aspersor. O mosto em fermentação passa pela parte central do fermentador, onde ocorre a oxidação do álcool a ácido acético. Na parte inferior, coleta-se o vinagre quando pronto.

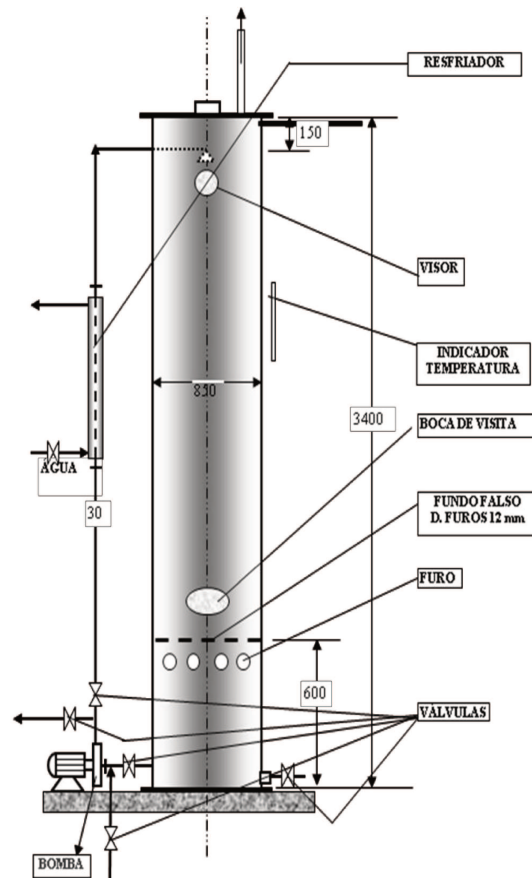


Figura 3: Diagrama do acetificador rápido

3.6 Aparato de Filtração

A etapa da filtração do vinagre obtido, para separar as bactérias provenientes das descargas do gerador de fermentação acética, foi realizada em um sistema para microfiltração tangencial, que consiste em tubos microporosos de polipropileno, com poros de tamanho 0,2 μm . O diâmetro dos capilares varia entre 1,8 e 2,6 mm. Os tubos não requerem estrutura de suporte, estão aglutinados em módulos e a superfície de filtração da membrana é de 0,04 m^2 .

O filtro é durável, tendo uniformidade quanto às dimensões de porosidade das partículas, e possui também alto índice de fluxo. O módulo de filtração é composto por capilares dispostos em paralelo. O vinagre não filtrado é bombeado continuamente e recircula por dentro dos capilares. Apenas uma pequena porção de líquido atravessa a parede da membrana desses capilares, deixando o módulo isento de bactérias contidas no vinagre bruto.

A bomba de alimentação bombeia o vinagre bruto por meio de um pré-filtro para um tanque de recirculação. No pré-filtro ficam retidas as partículas maiores, que podem causar prejuízos aos capilares dos módulos individuais. O sensor de nível do tanque de recirculação é controlado por eletrodos que acionam e param a bomba de recirculação automaticamente, abrindo e fechando as válvulas pneumáticas quando necessário. O sistema de microfiltração está apresentado na Figura 4.

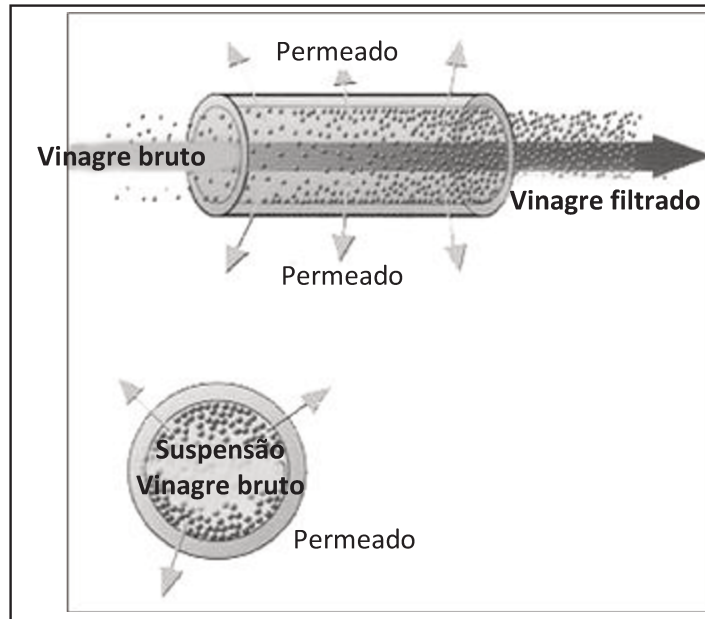


Figura 4. Esquema do microfiltro de fluxo tangencial.
Fonte: SPINOSA, 1996

3.7 Obtenção dos vinagres

3.7.1 Fermentação alcoólica

Os mostos de frutas foram obtidos por simples maceração ou despulpamento das matérias-primas. Em seguida, o preparado enzimático Pectinex® Ultra SPL foi adicionado em quantidade suficiente (0,4g/Kg de mosto), com o objetivo de degradar pectinas altamente ramificadas e solubilizar os sacarídeos presentes nas paredes celulares, liberando suco intracelular contido nos vacúolos, diminuindo o bagaço e aumentando assim o rendimento do processo. Após o tratamento enzimático, foi feita a correção do teor de açúcar com sacarose até que se alcançasse um teor de sólidos solúveis entre 18 a 20°Brix.

A condução do processo fermentativo se iniciou com a adição do inóculo de *S. cerevisiae* “Y904” na proporção de 10% (p/v), previamente re-suspendido com solução de sacarose (10°Brix) a 35-40°C por 15 minutos. O volume do fermentado foi de 300 litros e a temperatura foi mantida entre 25 e 27°C. O controle da fermentação foi feito por meio das medidas do brix e do teor alcoólico. O consumo total açúcar ou a estabilização do brix

indicou o final da fermentação. O fermentado alcoólico foi retirado por meio de válvula posicionada acima da região cônica, ponto de decantação das leveduras.

Não houve esta etapa para os vinagres de arroz, cana-de-açúcar e milho, pois estes foram obtidos a partir dos respectivos destilados etanólicos.

3.7.2 Fermentação acética

Os destilados etanólicos de milho e arroz foram diluídos com água potável até a concentração de 10% (v/v) de etanol e complementados em nutrientes com adição de Acetozim DS[®] (minerais e aminoácidos produzido pela Frings Microdin do Brasil) na proporção de 1 g/L. A cachaça (cana-de-açúcar) foi diluída com água potável até a concentração de 10% (v/v), sem adição de nutrientes.

Os fermentados de frutas e mel foram usados sem adição de minerais e aminoácidos no processo de fermentação acética. A riqueza em nutrientes das matérias-primas tornou desnecessário qualquer tipo de suplementação.

A fermentação acética por fermentador rápido foi conduzida pelo método de batelada alimentada. O volume inicial das fermentações foi de 90 litros e as trocas de calda foram de 30 litros cada. Não houve adição de inóculo, pois o fermentador estava em operação e o material de suporte (bambu) se encontrava coberto por zoogleia de bactérias acéticas. Quando o teor alcoólico se aproximava de 0,5% era retirado 1/3 do volume de vinagre do reator e adicionado o mesmo volume de mosto, introduzido lentamente. O controle do processo foi realizado por meio de análises de acidez e teor alcoólico, sendo esse último o indicador do ponto de troca de calda. O resfriador era acionado quanto a temperatura atingia 34°C. Ao fim das fermentações de cada matéria-prima, o fermentado era totalmente drenado e o processo reiniciado com novo mosto.

3.8 Determinações

3.8.1 Acompanhamento dos processos fermentativos

Durante os processos fermentativos foram realizadas análises de etanol e ácido acético, por ebulliometria e titulação com NaOH 0,1N, respectivamente (ZANCANARO JR, 1988, SPINOSA, 1996, SPINOSA, 2002) . Estequiometricamente tem-se 1 litro de etanol produzindo 1,036 kg de ácido acético e 0,313 kg de água. Durante o processo fermentativo, ocorre um aumento de volume na ordem de 1 a 3% da concentração de etanol utilizado. Isto significa que aproximadamente 1% (v/v) de etanol produz 1% (p/v) de ácido acético. Esta relação é tomada como base para os cálculos de rendimento para a previsão da acidez do produto. Considerando-se nulas as perdas por evaporação e por sobreoxidação, tem-se que a soma da concentração do etanol (% v/v) e do ácido acético (% p/v) é igual à concentração total (CT) ou *GK*, do alemão *Gesammte Konzentration*. A CT (*GK*) é constante durante todo o processo de acetificação (Adams, 1998).

A solução contendo etanol no processo industrial é chamada de calda. Já o quociente entre a concentração de ácido acético do vinagre produzido e a "concentração total" da calda dá o rendimento em ácido ($Y_{\text{ácido}}$) (EBNER, 1983, EBNER, FOLLMANN, SELLMER, 1983).

Lima et al. (2001^b) descreveram o rendimento como sendo um produto da quantidade de produto formado pela concentração total de substrato e produto.

$$Y_{\text{ácido}} = \frac{\%acidez_{\text{produto}}}{\%CT_{\text{calda}}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$Y_{\text{ácido}}$ = rendimento em ácido.

$\%acidez_{\text{produto}}$ = concentração de ácido acético produzido (%);

$\%CT$ = concentração total da calda (%(v/v) de etanol + %(p/v) de ácido acético);

3.8.2 Caracterização físico-química dos vinagres produzidos

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, órgão governamental que normatiza e fiscaliza a produção de bebidas e vinagres no Brasil, em sua Portaria nº 76 de 27 de novembro de 1986, estabelece os métodos analíticos de bebidas e vinagre. Esta portaria foi regulamentada pelo Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres, elaborado pela Coordenação Geral de Apoio Laboratorial – CGAL, ligada à Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA. Os métodos de análises de vinagres encontram-se no caderno 06 do referido manual (BRASIL, 2005).

Os vinagres produzidos ao longo deste trabalho foram submetidos às análises contidas no manual acima mencionado, sendo as técnicas descritas a seguir.

3.8.2.1 Grau alcoólico real

É um método densimétrico, baseado na separação do etanol por destilação da amostra e sua posterior quantificação de acordo com a densidade relativa do destilado a 20°C (BRASIL, 2005).

Foram medidos 200 mL da amostra em um balão volumétrico, anotando sua temperatura inicial. A amostra foi transferida para um balão destilatório com pérolas de vidro. O balão volumétrico de 200 mL foi lavado 4 vezes com 5 mL de água destilada, que foram juntados ao conteúdo do balão destilatório. Em seguida, o conteúdo do balão destilatório foi neutralizado com hidróxido de sódio 5 N, usando papel de tornassol como indicador. Cerca de $\frac{3}{4}$ do volume inicial foi destilado em um aparelho de destilação de Kjeldahl e recolhido no balão volumétrico empregado anteriormente, já com 10 mL de água destilada e mantido em banho de gelo durante a destilação.

Terminado o processo, o volume do balão foi completado, à mesma temperatura inicial, com água destilada e foi realizada a agitação do mesmo. A determinação do grau alcoólico real a 20 °C é calculada fazendo a leitura da tabela contida

do manual de métodos, que relaciona a densidade (obtida por alcoômetro) do destilado a 20 °C e o seu grau alcoólico correspondente (BRASIL, 2005).

3.8.2.2 Acidez Volátil

A acidez volátil das amostras de vinagre foi determinada por método titulométrico, baseado na separação dos ácidos voláteis efetuada por meio de arraste de vapor d'água e retificação dos vapores, com posterior titulação com solução de hidróxido de sódio, utilizando-se fenolftaleína como indicador (BRASIL, 2005).

Uma alíquota de 20 mL da amostra de vinagre foi transferida com pipeta para um balão volumétrico de 500 mL, sendo o volume do balão completado com água destilada. Uma alíquota de 10 mL da amostra diluída foi adicionada no borbulhador do aparelho de destilação Cazenave-Ferré com posterior adição de 250 mL de água destilada, previamente neutralizada com NaOH 0,1N. Levou-se a água à ebulição, com o registro de vapor aberto, para eliminação do ar do aparelho e de eventual gás carbônico da água destilada. Em seguida, a torneira foi fechada para que o vapor de água borbulhasse na amostra, arrastando os ácidos voláteis. Foi recolhido então, 100 mL do destilado, que foi titulado com hidróxido de sódio 0,1 N, na presença de fenolftaleína. Os resultados foram calculados conforme Equação 2, sendo a acidez volátil expressa em g ácido acético/100 g ou 100 mL (BRASIL, 2005).

$$A_v = \frac{n \times N \times Eq \times f}{10 \times V} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

A_v = acidez volátil, em gramas de ác. Acético/100 mL da amostra.

n = volume da solução de hidróxido de sódio gastos na titulação em mL.

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

$Eq.$ = equivalente grama do ácido acético (60)

V = volume da amostra em mL.

f = fator de diluição (20:500, $f=25$)

3.8.2.3 Cinzas

A determinação das cinzas dos vinagres produzidos foi feita por método gravimétrico, fundamentado na eliminação da matéria orgânica e inorgânica volátil quando a amostra é incinerada a $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$, sem apreciável decomposição dos constituintes do resíduo mineral.

Foram adicionados 25 mL da amostra em cadinhos previamente aquecidos a 600°C por 10 minutos e tarados. O conjunto foi levado até a secura em banho maria fervente e em seguida completamente carbonizado em bico de Bunsen e enviados à mufla a uma temperatura de 500°C , até que o resíduo se tornasse branco ou acinzentado. Após resfriamento dos cadinhos em dessecador, o conjunto foi pesado e o resultado da massa do cadinho com cinzas foi subtraído da tara do mesmo. Para obtenção do resultado em gramas por litro (g/L) o resultado foi multiplicado por 40, uma vez que foram utilizados 25 mL da amostra. O cálculo está demonstrado na Equação 3 (BRASIL, 2005).

$$\text{Cinzas, em g/L} = 40 \times (a - b) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

a = massa do cadinho com cinzas

b = massa do cadinho

3.8.2.4 Extratos secos total e reduzido

Obteve-se o extrato seco total por meio da evaporação lenta em banho maria a 100°C de 25 mL da amostra em cápsula de evaporação cilíndrica de fundo plano com 55 mm de diâmetro, previamente tarada, durante 3 horas consecutivas em contato direto com o vapor produzido pelo banho de água. Em seguida, a cápsula foi colocada numa estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. A cápsula de evaporação foi colocada num dessecador para que, após esfriamento esta pudesse ser pesada. Para obter o extrato seco total em gramas

por litro (g/L), o valor da massa do extrato foi multiplicada por 40, já que foram usados 25 mL da amostra na determinação.

O extrato seco reduzido foi obtido pela diferença do valor do extrato seco total e dos açúcares totais e sulfatos quem excedem 1 g/L, conforme a equação abaixo (BRASIL, 2005).

$$ESR_{g/L} = ES - (AT - 1) - (S - 1) \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

ES = extrato seco total, em g/L,

AT = açúcares totais, em g/L, [quando os açúcares forem menores que 1 g/L, desprezar o termo (AT-1)].

S = sulfatos, em g/L [quando os teores de sulfato forem menores que 1,0 g/L, desprezar o termo (S - 1)].

3.8.2.5 Sulfatos

Para a determinação de sulfatos das amostras foi utilizado método semi-quantitativo, baseado na precipitação do íon sulfato por meio de uma solução de concentração conhecida de cloreto de bário (BRASIL, 2005).

Alíquotas de 10 mL da amostra foram transferidas para três tubos de ensaio (A, B e C), os quais foram aquecidos em banho-maria durante 10 minutos para eliminação do ácido acético. Cada tubo recebeu uma quantidade diferente [3,5 mL (Tubo A), 5 mL (Tubo B) e 7,5 mL (Tubo C)] do Licor de Marty (2,804g de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ + 10 mL HCl, diluídos em 1000 mL com água destilada) e foram levados a um banho-maria em ebulição por 5 minutos. Após resfriados e filtrados, os volumes de cada tubo foram divididos em 2 outros tubos com volumes iguais (tubos a e a'; b e b', c e c'). Em um dos tubos foi adicionado 1mL de uma solução de cloreto de bário a 10% e, no outro, 1 mL de uma solução de ácido sulfúrico 1N.

Os resultados foram avaliados de acordo com o seguinte diagrama (Figura 5):

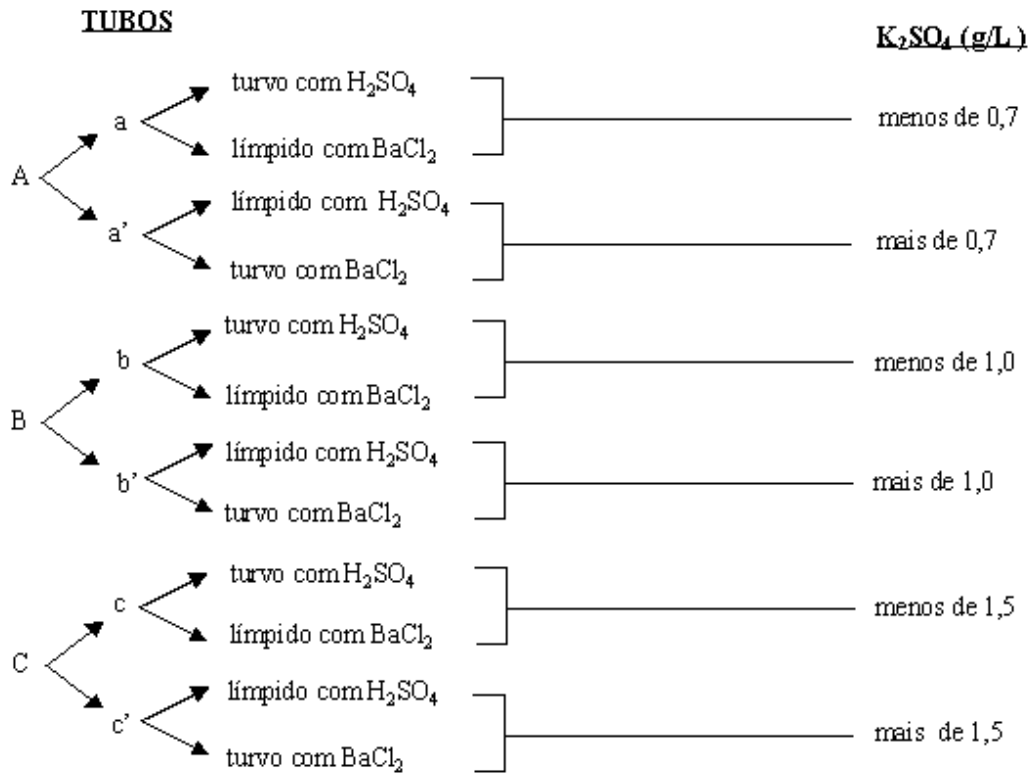


Figura 5: Diagrama para determinação de Sulfatos em Vinagres

Fonte: (BRASIL, 2005).

3.8.2.6 Açúcares Totais

Os açúcares totais dos vinagres produzidos foi determinado pelo método *Eynon Lane*, uma análise titulométrica que tem como princípio a reação dos monossacarídeos com os íons cúpricos da solução de *Felling*, reduzindo-os a íons cuprosos, sob a ação do calor em meio alcalino. Ao reagir com os íons cúpricos, os açúcares sofrem oxidação, enquanto o Cu (II) é reduzido a Cu (I), formando-se um precipitado vermelho de óxido cuproso (BRASIL, 2005).

Foram transferidos 100 mL da amostra para um béquer de 250 mL e neutralizados com solução de hidróxido de sódio 5 N. Em banho-maria, foi feita evaporação até reduzir o volume a 25 mL. Após resfriamento da amostra o volume foi completado 100 mL com água destilada e filtrada em papel de filtro.

Uma alíquota de 50 mL da amostra assim preparada foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, onde foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico concentrado. Após 15 minutos em banho-maria a uma temperatura entre 67 °C e 70 °C e resfriada, a amostra foi neutralizada com uma solução saturada de carbonato de sódio, usando papel de tornassol como indicador. O volume foi completado com água destilada até 100 mL, sob agitação.

Uma amostra controle, preparada com 50 mL de água destilada e 19 mL de uma solução padrão de glicose anidra 0,5% foi levada à fervura com 20 mL de solução de Soxhlet (34,639 g/L de sulfato de cobre pentahidratado, 173,0 g/L de tartarato duplo de sódio e potássio e 50,0 g/L de hidróxido de sódio) em um Erlenmeyer de 250 mL. Iniciada a ebulição, foram adicionadas 3 gotas de azul metileno. Decorrido um minuto do início da fervura, realizou-se titulação com a mesma solução de glicose até o desaparecimento da coloração azul. Esta operação foi repetida até que os resultados em duplicata fossem iguais.

Para a titulação da amostra, 10 mL da mesma foram adicionados a um Erlenmeyer de 250 mL com 20 mL de solução de Soxhlet e 50 mL de água destilada. O frasco foi levado ao aquecimento, de modo que entrasse em ebulição dentro de 4 minutos, e imediatamente foi transferida uma quantidade de glicose determinada em titulação prévia. Iniciada a fervura, 2 gotas de azul de metileno foram adicionadas e após 1 minuto, a titulação com solução de glicose foi continuada, até o desaparecimento do azul da solução. A operação também foi repetida até que as duplicatas apresentassem resultados iguais.

O resultado foi expresso em g/L, pela seguinte fórmula:

$$ATG = \frac{(b-a)}{v} \times 5 \times f_1 \times f_2$$
 Equação 5

Onde:

f_1 = fator que envolve todas as diluições (desde a tomada da alíquota inicial até amostra preparada para a titulação dos AR) e as grandezas de massa ou volume usadas na tomada da amostra.

ATG = açúcares totais em glicose em g/L.

f_2 = 1, fator de conversão para expressão dos resultados em glicose.

a = número de mL da solução de glicose gastos na titulação da amostra.

b = número de mL da solução de glicose gastos na titulação do branco.

v = volume da amostra preparada usado na titulação, em mL.

3.8.3 Álcoois, Ésteres, Aldeídos e Cetonas

A presença e a concentração de álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas foram determinadas por cromatografia gasosa. As amostras foram previamente filtradas em membrana de 0,22 μ m.

As condições de operação adotadas estão a seguir.

- Temperatura do detector: 150°C, do ionizador: 200°C e da coluna: 125°C
- Vazão de oxigênio: 4 mL/s, de nitrogênio: 35 mL/s e de hidrogênio: 35 mL/s
- Coluna empacotada Porapak Q, 2 metros e 0,8 mm de diâmetro.

Foram utilizados, como referência, os seguintes padrões: etanol, álcool isobutílico, hexanol, octanol, acetato de etila, acetato de butila, acetato de isoamila, acetaldeído e diacetil.

3.8.4 Compostos Fenólicos Totais

O compostos fenólicos totais foram quantificados por reação com reagente de Folin-Ciocalteu pela metodologia descrita por Singleton e colaboradores (1999), modificada por Meinhart e colaboradores (2010). Uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra foi colocada em tubos de ensaio e adicionados 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10% em água destilada. Após 5 min, 2 mL de solução de carbonato sódio a 7,5% foi adicionada. Os tubos foram mantidos por 2 h protegidos da luz. Foi realizada a medida da absorvância em espectrofotômetro a 740 nm.

Foi utilizada uma curva padrão, com soluções de ácido gálico entre 0,01 e 0,08 mg/mL e os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de ácido gálico por 100 mL.

3.8.5 Determinação da capacidade Antioxidante

A atividade antioxidante das amostras e padrões foi determinada por meio do método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Este radical possui cor púrpura, absorvendo na região do visível em 517nm. Espécies antioxidantes neutralizam o radical DPPH, que passa a ter cor amarela, não mais absorvendo energia em 517nm. Logo, a quantidade de DPPH neutralizado pelo antioxidante pode ser mensurada por meio de leitura em espectrofotômetro a 517nm, sendo que quanto mais intenso for o decaimento na absorvância do DPPH, mais intensa será a ação do antioxidante.

Para avaliar a atividade antioxidante das amostras foi utilizado o ácido gálico, um conhecido antioxidante. Foi construída uma curva padrão preparando soluções metanólicas de ácido gálico nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μ g/mL.

A reação ocorreu misturando 3,9mL da solução de DPPH (0,06mM) e 0,1mL da amostra, com vigorosa agitação e posterior repouso por 20 minutos ao abrigo de luz. Após esse período foram efetuadas as leituras em 517nm. Uma solução controle, de 0,1mL

de metanol também foi submetida à leitura. Foi calculado o %SRL (sequestro de radicais livres) por meio da equação 6.

$$\%SRL = \frac{(Abs_{Controle} - Abs_{Amostra}) \times 100}{Abs_{Controle}} \quad \text{Equação 6}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimentos dos processos de fermentação acética

A Tabela 1 mostra os parâmetros de processos obtidos ao longo dos processos de fermentação alcoólica e acética. Traz, ainda, o rendimento em ácido acético ($Y_{\text{ácido}}$).

Tabela 1. Parâmetros obtidos no processo de obtenção dos vinagres.

Matéria-prima	Calda			Vinagre			$Y_{\text{ácido}}$
	Etanol °GL	Acidez % (p/v)	CT %	Etanol °GL	Acidez % (p/v)	CT %	
Arroz	11,0	0,0	11,0	0,4	8,7	9,1	0,79
Cana	11,0	0,0	11,0	0,8	6,7	7,5	0,61
Milho	11,0	0,0	11,0	0,2	7,8	7,9	0,71
Mel	6,7	0,3	7,0	0,1	5,4	5,5	0,78
Carambola	8,6	1,0	9,6	0,1	6,2	6,3	0,64
Kiwi	8,4	1,2	9,6	0,1	7,1	7,2	0,75
Laranja	7,8	0,7	8,5	0,1	6,4	6,5	0,75
Maçã	7,1	0,7	7,8	0,1	5,8	5,9	0,74
Maracujá	4,2	2,6	6,8	0,1	4,9	5,0	0,73
Toranja	8,6	1,6	10,2	0,1	5,5	5,6	0,54
Uva	10,9	1,0	11,9	0,5	8,8	9,3	0,73

CT: Concentração Total [soma das concentrações de etanol (% v/v) e ácido acético (% p/v)]

$Y_{\text{ácido}}$: rendimento em ácido (%acidez do produto / %CT da calda)

Os dados obtidos ao longo dos processos fermentativos foram usados para calcular o rendimento em ácido acético (LIMA et al., 2001^b). Os valores de rendimento dos processos de fermentação acética variaram entre 0,54 (toranja) e 0,79 (arroz). Esses valores estão abaixo dos esperados para um rendimento em escala industrial, especialmente se compararmos com fermentações conduzidas pelo processo submerso. Santos Junior (2009) estudou as necessidades nutricionais de bactérias acéticas para produção de ácido e encontrou valores de rendimento entre 0,81 e 0,90. As diferenças entre os valores podem ser explicadas pelo método de fermentação utilizado e mostram papel relevante do oxigênio na formação do vinagre. Santos Junior trabalhou com o processo submerso, em reator piloto, com injeção controlada de oxigênio (35 L/h) e o presente trabalho foi conduzido pelo processo rápido, no qual a oxigenação se dá pela simples circulação do mosto.

Ghommidh, Cutayar e Navarro (1986) relatam que nenhuma outra técnica foi capaz de substituir a da fermentação submersa para a produção de vinagre, justamente por suas altas taxas de rendimento.

A acetificação pelo processo submerso parece se adequar mais aos padrões industriais modernos, sob o ponto de vista de rendimento e produtividade. No entanto, a produção de vinagres de frutas em pequena escala, usando excedente de produção ou mesmo usando frutas que seriam rejeitadas pode ser mais vantajosa se conduzida pelo processo rápido. Além de menor infra-estrutura, que resulta em menores gastos, o processo rápido é menos sensível a interrupções na produção que o processo submerso (ZANCANARO, 1988; SPINOSA, 1996, SU; CHIEN, 2010).

As diferenças entre os valores de rendimento obtidos neste trabalho podem estar relacionadas com o fato de as fermentações terem sido conduzidas em datas diferentes, que implica em diferentes temperaturas ambientes. O fermentador onde foram conduzidos os processos dispõe apenas de sistema de resfriamento, ocorrendo redução na temperatura do mosto em dias frios, mesmo sendo a fermentação acética um processo exotérmico. Além disso, a variação dos nutrientes disponíveis nas matérias-primas utilizadas e os diferentes valores de acidez do mosto também podem explicar as diferenças nos rendimentos, uma vez que esses fatores são fundamentais para obtenção de elevados valores deste parâmetro (ORY; ROMERO; CANTERO, 1998; SPINOSA, 2002; SANTOS JUNIOR, 2009).

4.2 Caracterização dos vinagres produzidos

Os resultados obtidos para os parâmetros de acidez volátil, acidez total, pH, extrato seco, açúcares totais e cinzas nos vinagres produzidos constam na Tabela 2.

Os valores de acidez total variaram bastante entre as amostras produzidas, sendo a de maior acidez a de vinagre de uva (8,76 g/100 mL) e a de menor a de vinagre de maracujá (4,94g/100 mL). As diferenças na concentração de etanol e na acidez dos mostos

usados no processo de fermentação acética e a variação nos rendimentos dos processos podem explicar as diferenças nos valores finais de acidez.

Tabela 2. Resultados das análises de caracterização dos vinagres produzidos, utilizando os métodos analíticos oficiais para análise de vinagres.

Amostra (Vinagres)	Acidez Total (g/100mL)	Acidez volátil em ácido acético (g/100mL)	Acidez fixa (g/100mL)	pH	Extrato Seco à 100°C (g/L)	Cinzas à 550°C (g/L)	Açúcares Totais em Glicose (g/L)
Arroz	8,68	8,32	0,36	2,65	1,20	0,48	< 0,5
Cana	6,70	6,22	0,48	2,80	1,46	0,48	< 0,5
Milho	7,78	7,50	0,28	2,72	1,18	0,29	< 0,5
Mel	5,45	4,52	0,93	2,85	6,89	0,91	2,51
Carambola	6,18	5,64	0,54	3,20	10,34	1,52	3,79
Kiwi	7,14	6,90	0,24	3,14	23,88	4,04	3,29
Laranja	6,40	5,84	0,56	3,12	19,18	2,91	4,85
Maçã	5,78	3,75	2,03	3,41	20,18	1,90	9,43
Maracujá	4,94	4,27	0,67	3,18	24,99	3,84	1,54
Toranja	5,49	4,35	1,14	3,09	27,51	2,76	2,64
Uva	8,76	8,02	0,74	3,03	15,56	1,65	2,27

Os vinagres de arroz, milho e cana estão entre os que apresentaram maior acidez total (7,78; 8,68 e 6,7 g/100 mL, respectivamente) e menor acidez fixa (0,36; 0,28 e 0,48 g/100 mL, respectivamente). Os baixos valores de acidez fixa já eram esperados, pelo fato de estes vinagres serem provenientes de substrato destilado e seu conteúdo ácido ser devido fundamentalmente ao ácido acético, proveniente do processo de fermentação. Artiles, Romero e Torre (1993) em seu trabalho de caracterização físico-química de vinagres, analisaram 10 amostras de vinagres de álcool produzidos na Alemanha e constataram a ausência, em todas as amostras, de acidez fixa. Apesar de o trabalho ter sido conduzido com vinagres comerciais e não mencionar seu método de fabricação, a origem dos produtos sugere que tenham sido feitos pelo processo submerso, o que pode explicar a diferença, mesmo que pequena, nos resultados.

Entre os vinagres de frutas, os produzidos com uva e kiwi foram os que apresentaram maior acidez total (8,76 e 7,14 g/100 mL, respectivamente). O vinagre de uva apresentou maior acidez fixa que o de kiwi, tanto em números absolutos quanto proporcionalmente. Enquanto o fermentado acético de kiwi apresentou 0,24 g/100 mL de acidez fixa (3,36% do total de acidez), o vinagre de uva apresentou 0,74 g/100 mL, o que corresponde a 8,45% de sua acidez total. No trabalho realizado por Artiles, Romero e Torre (1993) o valor mais alto de acidez fixa em 26 amostras de vinagre de uva foi de 0,17 g/100 mL.

Ainda avaliando os parâmetros relacionados à acidez das amostras, a partir dos resultados da análise de pH podemos dividir as amostras em dois grupos. Os vinagres produzidos com frutas apresentaram valores maiores ou iguais a 3,0 enquanto que as amostras produzidas a partir de produtos destilados (arroz, cana e milho) mostraram resultados variando entre 2,65 e 2,80. Os vinagres obtidos a partir de frutas e mel parecem possuir substâncias capazes de tamponar os ácidos do produto, contribuindo para um aumento nos valores de pH, enquanto que nos vinagres com escassez de compostos secundários, que é o caso dos obtidos a partir de destilados, esse efeito não pôde ser observado.

Os fermentados acéticos de toranja, maracujá e kiwi apresentaram os valores mais elevados de extrato seco entre as amostras (respectivamente 27,51; 24,99 e 23,88 g/L). Os vinagres de maçã e laranja ficam em quarto e quinto lugares se considerarmos o extrato seco total (20,18 e 19,18 g/L) e invertem as posições se considerarmos o extrato seco reduzido (15,32 g/L para o de laranja e 11,75g/L para o de maçã). O extrato seco reduzido é obtido pelo valor de extrato seco total diminuído dos açúcares totais e dos sulfatos que excederem 1 g/L. O conteúdo de açúcares do produto obtido a partir da maçã (9,43 g/L) foi notadamente maior que o da laranja (4,85 g/L), o que explica os resultados apresentados. Os sulfatos não interferiram nesses valores por não excederem 1g/L em nenhuma das amostras produzidas. Todos os vinagres de frutas apresentaram valores de extrato seco reduzido acima de 7,0 g/L, padrão estabelecido pela Portaria n° 745, de 24 de outubro de 1977, do Ministério da Agricultura. Artiles, Romero e Torre (1993) encontraram valores

bastante similares ao estudarem nove amostras de vinagre de maçã, sendo cinco amostras da Alemanha e quatro da Espanha. O valor médio dos extratos secos destes vinagres foi de 21,2 g/L, sendo que os vinagres alemães apresentaram valores mais altos para essa fração dos produtos, o que justificou o alto coeficiente de variação encontrado.

Os fermentados acéticos de milho, arroz e cana-de-açúcar apresentaram os menores valores de extrato seco entre os produzidos, respectivamente 1,18, 1,20 e 1,46 g/L. O baixo conteúdo de compostos não voláteis nas matérias-primas usadas na produção destes vinagres explica os resultados obtidos. Como já se esperava, os vinagres de milho e arroz, produzidos a partir de destilados de maior graduação alcoólica apresentaram valores menores de extrato seco que o produzido com cachaça (cana-de-açúcar), que tinha graduação alcoólica de 40° GL. Como os valores de açúcares totais e de sulfatos não excederam 1 g/L, não houve diferença entre o extratos secos total e reduzido.

No que se refere ao conteúdo de cinzas, observa-se que os vinagres de kiwi e maracujá apresentaram os valores mais elevados (4,04 e 3,84 g/L, respectivamente). No caso de uma padronização para comercialização, em que estes produtos seriam diluídos para atingir 4g/100 mL de acidez total o fermentado acético de maracujá apresentaria maior valor de cinzas que o de laranja, pois seria menos diluído, já que apresenta menor acidez.

O vinagre de milho apresentou o menor valor de cinzas, 0,29 g/L, seguido pelos vinagres de arroz e cana-de-açúcar, ambos com 0,48 g/L. Estes valores se devem tanto ao conteúdo mineral do substrato, reconhecidamente pobre, quanto, nos casos dos vinagres de milho e arroz, à suplementação realizada com Acetozim® no preparo do mosto para a fermentação acética.

A média dos valores de cinzas dos vinagres feitos a partir de destilados (0,42 g/L) foi menor que a dos vinagres feitos com frutas e suas polpas (1,02 g/L) e o coeficiente de variância também foi menor (0,2632) para os vinagre de destilados e 0,3842 para os de frutas). A maior variação nos resultados de cinzas nos vinagres de frutas pode ser explicada pela grande variedade entre o conteúdo mineral das matérias-primas utilizadas e também

pela possível mudança no requerimento de minerais das leveduras e bactérias acéticas quando em contato com os demais nutrientes presentes em matrizes complexas, como é o caso dos mostos de frutas.

A relação entre extrato seco e cinzas é sugerida como uma forma de oferecer informações sobre possíveis adições de açúcares e outros compostos, que apesar de aumentarem o extrato seco, não interferem no conteúdo mineral. A princípio, o intervalo aceito para essa relação ficava entre 4 e 8, sendo posteriormente ampliado para valores entre 3 e 8 (TRONCOSO; GUZMÁN, 1988 apud ARTILES; ROMERO; TORRE, 1993). Rizzon e Meneguzzo (2002), afirmam que essa relação, para vinagres de vinho branco e vinho tinto brasileiros, deve estar entre 3,5 e 8. O vinagre de arroz produzido apresentou relação extrato seco e cinzas abaixo da recomendada (2,51) e os vinagres de uva, toranja e maçã mostraram valores acima do indicado (9,43, 9,97 e 10,62, respectivamente).

Os resultados obtidos para os parâmetros de grau alcoólico, metanol, sulfato, cloretos e dióxido de enxofre nos vinagres produzidos constam na Tabela 3, abaixo. Estas análises, juntamente com as anteriores, completam o padrão de identidade e qualidade de vinagres no Brasil (BRASIL, 1986).

Tabela 3. Resultados das análises de caracterização dos vinagres produzidos, utilizando os métodos analíticos oficiais.

Amostra (Vinagres)	Grau Alcoólico (%)	Metanol (mg/L)	Dióxido de Enxofre (mg/L)	Sulfatos expressos em K ₂ SO ₄ (g/L)	Cloretos Totais expressos em NaCl (mg/L)
Arroz	0,4	1130,65	9,6	< 1,0	105,30
Cana	0,85	1101,61	9,6	< 1,0	81,90
Milho	0,2	1139,01	9,6	< 1,0	87,75
Mel	0,1	1159,35	3,2	< 1,0	52,65
Carambola	0,1	1334,47	22,4	< 1,0	40,95
Kiwi	0,1	1218,99	22,4	< 1,0	64,35
Laranja	0,1	1244,39	12,8	< 1,0	111,15
Maçã	0,1	1360,70	9,6	< 1,0	70,20
Maracujá	0,1	1343,64	12,8	< 1,0	146,25
Toranja	0,1	1219,17	12,8	< 1,0	58,50
Uva	0,5	1307,34	12,8	< 1,0	17,50

A determinação do grau alcoólico dos vinagres produzidos mostrou que todos estavam dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira, que é 1,0 % (v/v). O vinagre de cana foi o que mais se aproximou desse limite, com 0,85% de álcool, seguido pelos vinagres de uva (0,5%) e arroz (0,4%). Com exceção dos vinagres de uva, todos os vinagres feitos a partir de frutas ou de suas polpas apresentaram 0,1% de etanol. No trabalho de caracterização de vinagres brasileiros realizado por Rizzon e Miele (1998), a média dos valores de etanol nos produtos avaliados foi de 0,14% (p/v), variando de 0,04 a 0,22%. Por se tratarem de vinagres comerciais, tudo leva a crer que os produtos analisados neste trabalho tenham sido obtidos pelo processo submerso, que permite um melhor rendimento na acetificação, fazendo com que o conteúdo etanólico residual seja menor do que o observado nas amostras produzidas pelo processo rápido. Já no estudo conduzido por Artiles, Romero e Torre (1993) a graduação alcoólica dos produtos apresentou limites inferior e superior bem próximos aos obtidos neste trabalho (0,10 e 0,82%), sendo a menor média a dos vinagres de álcool (0,15%) e a maior nos vinagres de uva (0,32%).

A concentração de metanol variou pouco entre as amostras, que apresentaram uma média de 1232,66 mg/L e coeficiente de variação de 0,0756. O vinagre de maçã obteve a maior concentração do composto (1360,70 mg/L) e o de cana apresentou o menor valor (1101,61 mg/L). A legislação brasileira não estabelece limite de metanol em fermentados acéticos. Quanto à toxicidade do composto, alguns autores consideram tóxicas doses entre 20 e 60 mL (BLINDER; VOGES; LAUGE, 1988). O consumo de 5 mL dos vinagres produzidos levaria à ingestão de 5 a 7 mg de metanol, valores bem abaixo dos preconizados como potencialmente tóxicos (MEDINSKY; DORMAN, 1995).

Na Espanha, o teor de metanol nos vinagres de vinho não deve ultrapassar 1000 mg/L e na Itália o limite é 130 mg/L (RIZZON; MENEGUZZO, 2002). O valor médio obtido por Artiles, Romero e Torre (1993) para vinagres de uva, álcool, maçã e malte foi de 46,71 mg/L e os autores chamam a atenção para a diferença entre seus valores, obtidos por espectrofotometria e os de Troncoso e Guzmán (1988), que analisando vinagres por cromatografia chegaram a valores médios de 1234 mg/L. A sensibilidade da técnica, além de outros fatores, como matérias-primas e método de produção, ajudam a explicar a

diferença nos valores obtidos entre os autores. No presente trabalho os valores médios encontrados foram bem próximos aos de Troncoso e Guzmán.

4.3 Compostos Voláteis

Os vinagres obtidos neste estudo foram analisados para determinação das concentrações de alguns compostos voláteis considerados importantes no aroma do produto (KAHN; NICKOL; CONNER, 1972, DEL SIGNORE, 2000, CALLEJÓN et al., 2009, CALLEJÓN et al., 2010). A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos, com os valores mínimo e máximo, média e desvio padrão entre as amostras.

Tabela 4. Resultados dos teores dos compostos voláteis (mg/L) pesquisados nos vinagres produzidos e estatísticas básicas.

Amostra	Acetaldeído	Acetato de Etila	Acetato de Butila	Diacetil	Isobutanol	Hexanol
Arroz	44,79	96,34	nd	nd	nd	nd
Cana	121,56	209,11	857,70	161,41	763,07	nd
Milho	224,79	419,77	858,17	153,48	835,04	nd
Mel	217,76	593,75	nd	436,28	777,87	717,08
Carambola	410,35	140,62	858,65	219,37	762,26	715,41
Kiwi	566,11	316,59	858,76	244,02	776,37	704,60
Laranja	283,74	378,80	859,38	299,62	766,13	711,04
Maçã	69,75	57,21	nd	199,71	nd	706,68
Maracujá	511,89	46,95	nd	nd	nd	706,85
Toranja	384,24	64,42	nd	277,65	nd	nd
Uva	nd	152,64	911,99	1432,27	nd	709,46
Mínimo	nd	46,95	nd	nd	nd	nd
Máximo	566,11	593,75	911,99	1432,27	835,04	717,08
Média	257,73	225,11	473,15	311,26	425,52	451,92
D.P.	191,83	179,10	453,27	392,44	407,88	358,31

nd = não detectável pela técnica.

DP = desvio padrão

O vinagre produzido com kiwi foi o que mostrou a maior concentração total dos voláteis analisados, apresentando todos os compostos pesquisados em concentrações detectáveis pela técnica. O produto apresentou a maior concentração de acetaldeído entre os

fermentados acéticos (566,11 mg/L), o que não conferiu aspereza nem sensação de rancidez ao vinagre. Dependendo da concentração, o acetaldeído concede sabor descrito como “gramíneo” ou “maças esmagadas”, com *threshold* entre 0,1 e 1,5 mg/L (BERG et al., 1955, HINREINER et al., 1955, MACDONALD et al., 1984 apud OLIVEIRA, 2001). Além do vinagre de kiwi, os produzidos com carambola e polpa de laranja apresentaram todos os compostos pesquisados em concentrações detectáveis pela técnica.

Apenas no vinagre de uva não se detectou o acetaldeído. Callejón e colaboradores (2010) encontraram concentrações de acetaldeído entre 0,005 e 0,025 mg/L em vinagres de vinho tinto não envelhecidos. Estudando dezesseis amostras de vinagres balsâmicos da região de Modena e Reggio Emilia, na Itália, Del Signore (2001) encontrou resultados para acetaldeído que variaram entre 1,23 e 7,13 mg/L. Na fermentação acética, o acetaldeído é produzido por oxidação do etanol pela enzima álcool-desidrogenase. De acordo com Atkinson (1956), citado por Asai (1968), esta enzima é inibida por altas concentrações de ácido, o que pode explicar o fato de os vinagres de maior acidez (uva e arroz) terem apresentado os menores teores deste composto.

O vinagre de uva apresentou o maior teor de diacetil (1432,27 mg/L), composto que em contato com aminoácidos confere aroma frutado, mas em altas concentrações lembra manteiga rançosa (BERRY, 1995 apud OLIVEIRA, 2001). Del Signore (2001) encontrou o composto em concentrações que variaram entre 2,64 e 44,15 mg/L e Callejón et al. (2010) não detectou esta cetona em nenhuma das amostras de vinagre estudadas. Altas concentrações de diacetil costumam ser relacionadas à contaminação da fermentação alcoólica por bactérias como *Lactobacillus* e *Pediococcus* (BERRY, 1995 apud OLIVEIRA, 2001). Apesar da alta concentração de diacetil detectada por cromatografia, os defeitos relacionados a altos teores desse composto não estavam evidentes.

O fermentado acético de arroz apresentou menor concentração total dos compostos voláteis e também a menor variedade entre eles, sendo possível detectar apenas o acetaldeído (44,79 mg/L) e o acetato de etila (96,34 mg/L). Uma pequena quantidade de compostos secundários nos vinagres leva à predominância do gosto ácido, dificultando a

percepção de sensorial de qualquer outro composto, que não o ácido acético (SU; CHIEN, 2010).

O único composto volátil detectado em todas as amostras foi o acetato de etila, com concentrações variando entre 593,75 (mel) e 46,95 mg/L (maracujá). Este éster, de aroma frutado e floral (PEDDIE, 1990), além de estar presente em diversas matérias-primas é produzido pelas esterases intracelulares de *Acetobacter* na presença de etanol e ácido acético (KASHIMA et al., 1998), o que explicou sua prevalência nas amostras. O vinagre de milho, apesar de produzido a partir de destilado etanólico, apresentou a segunda maior concentração de acetato de etila (419,77 mg/L).

O vinagre de mel, além da alta concentração de acetato de etila, em comparação com as outras amostras, apresentou os maiores teores de isobutanol (777,87 mg/L), e hexanol (717,08 mg/L). Em baixas concentrações, os alcoóis superiores conferem características sensoriais desejáveis, como aromas “herbáceo” e “frutado” e em alguns casos podem ser descritos como “semelhante a solvente” e “alcoólico” (NYKÄNEM; NYKÄNEM apud OLIVEIRA, 2001). O *threshold* destes compostos costuma estar abaixo de 100 mg/L (SALO; NYKÄNEN; SUOMALAINEN, 1972). Além de conferir aroma, os alcoóis superiores podem ser importantes por sua ação solvente sobre outras substâncias, interferindo em sua volatilidade e, por consequência, em seus sensoriais (AMERINE; BERG; CRUESS, 1972 apud OLIVEIRA, 2001).

O fermentado acético de toranja foi o produto de frutas que teve a menor variedade nos compostos voláteis pesquisados, tendo concentrações detectáveis apenas de acetaldeído (384,24 mg/L), diacetil (277,65 mg/L) e acetato de etila (64,42 mg/L).

4.4 Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico

Os resultados obtidos nas determinações de compostos fenólicos totais pelo método de *Folin-Ciocalteu* e da capacidade antioxidante em relação ao radical DPPH constam na Tabela 5.

Tabela 5. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da porcentagem de sequestro do radical DPPH, do sequestro equivalente ao ácido gálico (EAG) e dos compostos fenólicos totais das amostras analisadas.

Amostra	%Sequestro do Radical DPPH	Atividade antioxidante eq. Ácido Gálico ($\mu\text{g/mL}$)	Fenóis Totais (mg EAG/100mL)
ARR1	-1,97 \pm 0,5634 (0,2857)	0,26 \pm 0,0125 (0,0479)	não detectado
ARR2	-2,58 \pm 1,6445 (0,6369)	0,25 \pm 0,0364 (0,1475)	não detectado
ARR3	26,43 \pm 1,0189 (0,0385)	0,89 \pm 0,0225 (0,0254)	9,47 \pm 0,0713 (0,008)
CAN1	-3,80 \pm 1,7982 (0,4729)	0,11 \pm 0,0819 (0,7205)	não detectado
CAN2	1,27 \pm 3,2394 (2,5556)	0,33 \pm 0,0717 (0,2160)	não detectado
CAN3	32,25 \pm 0,7319 (0,0227)	1,02 \pm 0,0162 (0,0159)	15,69 \pm 0,3913 (0,0249)
MIL1	4,74 \pm 1,2305 (0,2595)	0,41 \pm 0,0272 (0,0666)	não detectado
MIL2	8,54 \pm 1,1979 (0,1402)	0,49 \pm 0,0265 (0,0538)	não detectado
MIL3	30,14 \pm 0,7319 (0,0243)	0,97 \pm 0,0162 (0,0167)	9,58 \pm 0,1886 (0,0197)
MEL1	8,36 \pm 1,5831 (0,1894)	0,49 \pm 0,0350 (0,0717)	9,48 \pm 0,1921 (0,0203)
MEL2	8,56 \pm 2,7667 (0,3231)	0,49 \pm 0,0612 (0,1241)	13,10 \pm 0,2469 (0,0189)
MEL3	56,62 \pm 1,7077 (0,0302)	1,56 \pm 0,0378 (0,0243)	29,68 \pm 0,4197 (0,0141)
CAR1	84,08 \pm 0,9236 (0,0110)	2,16 \pm 0,0204 (0,0094)	195,29 \pm 0,1641 (0,0008)
CAR2	58,31 \pm 0,8796 (0,0151)	1,59 \pm 0,0195 (0,0122)	31,64 \pm 1,1201 (0,0354)
CAR3	69,53 \pm 2,1835 (0,0314)	1,84 \pm 0,0483 (0,0262)	28,16 \pm 0,3776 (0,0134)
KIW1	72,91 \pm 0,6351 (0,0087)	1,92 \pm 0,0141 (0,0073)	32,51 \pm 0,3703 (0,0114)
KIW2	69,15 \pm 0,6139 (0,0089)	1,83 \pm 0,0136 (0,0074)	49,03 \pm 0,0308 (0,0006)
KIW3	96,34 \pm 0,3726 (0,0039)	2,44 \pm 0,0082 (0,0034)	55,97 \pm 1,9300 (0,0345)
LAR1	91,22 \pm 3,9395 (0,0432)	2,32 \pm 0,0872 (0,0375)	51,50 \pm 0,4512 (0,0088)
LAR2	82,16 \pm 3,3399 (0,0407)	2,12 \pm 0,0739 (0,0348)	39,75 \pm 0,1766 (0,0044)
LAR3	92,02 \pm 1,4928 (0,0162)	2,34 \pm 0,0330 (0,0141)	50,49 \pm 0,9981 (0,0198)
MAC1	83,62 \pm 1,1384 (0,0136)	2,15 \pm 0,0252 (0,0117)	40,61 \pm 1,1565 (0,0285)
MAC2	89,81 \pm 1,7384 (0,0194)	2,29 \pm 0,0385 (0,0168)	57,54 \pm 0,2561 (0,0045)
MAC3	73,66 \pm 0,7319 (0,0099)	1,93 \pm 0,0162 (0,0084)	33,62 \pm 1,4868 (0,0442)
MAR1	70,00 \pm 1,1529 (0,0165)	1,85 \pm 0,0255 (0,0138)	38,45 \pm 1,0054 (0,0261)
MAR2	73,57 \pm 1,0940 (0,0149)	1,93 \pm 0,0242 (0,0125)	37,64 \pm 3,4876 (0,0927)
MAR3	76,81 \pm 4,2589 (0,0554)	2,00 \pm 0,0942 (0,0470)	34,09 \pm 0,7893 (0,0231)
TOR1	93,47 \pm 1,0571 (0,0113)	2,37 \pm 0,0234 (0,0099)	118,15 \pm 5,1471 (0,0436)
TOR2	77,32 \pm 3,7344 (0,0483)	2,01 \pm 0,0826 (0,0410)	62,82 \pm 0,2495 (0,0040)
TOR3	86,62 \pm 2,3271 (0,0269)	2,22 \pm 0,0515 (0,0232)	60,88 \pm 0,7759 (0,0127)
UVA1	93,66 \pm 0,8796 (0,0094)	2,38 \pm 0,0195 (0,0082)	56,14 \pm 0,7530 (0,0134)
UVA2	94,04 \pm 0,4946 (0,0053)	2,38 \pm 0,0109 (0,0046)	45,74 \pm 0,1645 (0,0036)
UVA3	98,31 \pm 0,2505 (0,0025)	2,48 \pm 0,0055 (0,0022)	34,42 \pm 1,3330 (0,0387)

ARR: arroz; CAN: cana; MIL: milho; CAR: carambola; KIW: kiwi; LAR: laranja; MAC: maçã; MAR: maracujá; MEL: mel; TOR: toranja; UVA: uva. 1: Matéria-prima; 2: Substrato alcoólico; 3: Vinagres.

A Tabela 5 mostra em primeiro lugar os resultados obtidos ao longo da produção dos fermentados acéticos de arroz, cana e milho, já agrupados anteriormente como os produtos obtidos a partir de destilados alcoólicos. Sob a ótica da atividade antioxidante e da composição fenólica esses produtos também formam um grupo com um padrão de repetição. As amostras indicadas pelo número 1 se referem aos destilados alcoólicos (arroz e milho) e à cachaça (cana), que apresentaram valores irrisórios de sequestro do radical DPPH e não detectáveis de compostos fenólicos totais. As caldas preparadas para a fermentação acética (ARR2, CAN2 e MIL2) mantiveram essas características, salvo o leve aumento no sequestro do radical DPPH nas amostras de cana e milho. Inicialmente pode-se pensar que a adição de Acetozim® foi responsável pela discreta elevação na atividade antioxidante da calda feita com etanol de milho, mas a similaridade com o resultado da cachaça diluída, que não recebeu suplementação, sugere a presença de algum contaminante analítico nos produtos, que quando diluído, diminui sua interferência, aumentando o sequestro do radical.

Os resultados das análises realizadas nos vinagres de arroz (ARR3), cana-de-açúcar (CAN3) e milho (MIL3) corroboram para a alocação destes produtos em um único grupo, além de trazer informações valiosas sobre o processo de fermentação acética. Esses vinagres apresentaram um sensível aumento tanto no sequestro do radical DPPH, quanto no conteúdo fenólico total, quando comparados com os produtos das etapas anteriores do processo. Nenhuma amostra de calda (indicadas pelo número 2) apresentou compostos fenólicos detectáveis pela técnica usada, enquanto que nos vinagres produzidos com estas, os fenóis totais foram detectados nas concentrações de 9,46 para o vinagre de arroz, 15,69 para o vinagre de cana e 9,58 para o de milho, sendo esses resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico/100mL. Como o aumento da atividade antioxidante coincidiu com o aparecimento dos compostos fenólicos, as correlações entre os resultados das duas variáveis ao longo dos três processos foram altas, apresentando coeficientes acima de 0,9. Apesar de serem encontrados na literatura científica relatos sobre a produção de compostos fenólicos por micro-organismos (MEISINGER et al., 1959, YEN; LEE, 1996, HAYASHI et al., 1995 apud HALL, 2001) não foram encontradas referências que relacionassem esses compostos com o metabolismo das bactérias acéticas.

Visualizando os resultados de todos os vinagres produzidos, os preparados a partir de destilados alcoólicos foram os mais pobres em teores de compostos fenólicos, apresentando também as mais baixas atividades antioxidantes. Esses resultados eram esperados e foram mencionados na literatura disponível. Spinosa (1996) relata que o etanol de cana, utilizado pela grande maioria dos fabricantes brasileiros por razões econômicas, é considerado uma das piores matérias-primas conhecidas. Bellini (2006) avaliou vinagres comerciais brasileiros e os produtos com menores teores de compostos fenólicos e índices de antioxidação foram justamente os preparados a partir de etanol. Em trabalho similar, Marques (2008) analisou vinagres comerciais de álcoois de cana, milho e arroz e de cachaça e encontrou valores de fenóis totais respectivos de 0,22, 3,13, 6,54 e 9,66 mg equivalentes de ácido gálico/100mL. O presente trabalho, apesar de também constatar as baixas concentrações de fenóis totais e pequena atividade no sequestro do radical DPPH desses produtos, mostra que o processo de fermentação acética conduzido foi capaz de agregar compostos fenólicos e aumentar a capacidade antioxidante de matérias-primas destiladas.

A produção de vinagre a partir de mel parece repetir o ocorrido no processamento das matérias-primas destiladas, mas em outro patamar quanto aos valores obtidos. O conteúdo fenólico total teve um pequeno aumento do mosto para o fermentado alcoólico (9,48 e 13,10 mg EAG/100mL, respectivamente), que foi incapaz de alterar a capacidade antioxidante ($8,36 \pm 1,58\%$ no mosto e $8,56 \pm 2,7667\%$ no fermentado alcoólico). A fermentação acética, no entanto, resultou num produto com conteúdo fenólico de 29,68mg EAG/100mL e capaz de sequestrar 56,62% do radical DPPH nas condições experimentais. A alta correlação (0,9864 e R^2 de 0,9730) entre a capacidade antioxidante e a concentração de fenólicos ao longo dos processos sugere que estes compostos sejam os principais responsáveis por essa característica.

A produção de vinagres a partir de frutas não gerou resultados tão padronizados como os preparados com destilados, já que nesses casos, a matéria-prima mostrou ter grande influência sobre o conteúdo fenólico total e sobre a atividade antioxidante, tanto nos fermentados alcoólicos quanto nos produtos de fermentação acética. A Figura 4 representa

de maneira gráfica as variações no sequestro do radical DPPH nas três etapas do processo produtivo dos vinagres de frutas (mosto, fermentado alcoólico e fermentado acético).

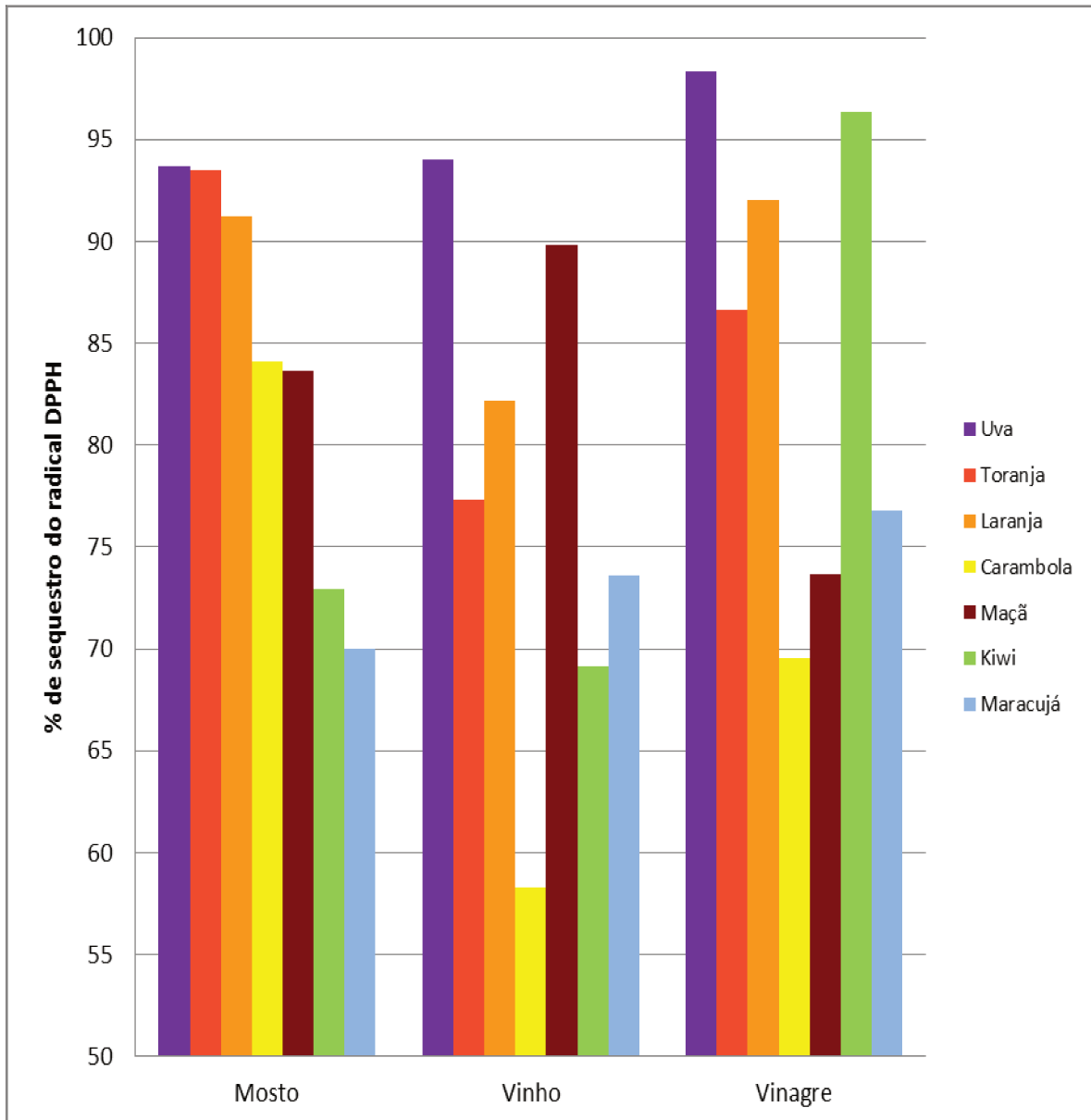


Figura 6: Sequestro do radical DPPH nos mostos de frutas e fermentados alcoólicos e acéticos

Entre os mostos de frutas avaliados, o de carambola apresentou a maior concentração de compostos fenólicos totais (195,29 mg/100mL), apesar de estar em quarto lugar quando avaliado o sequestro do radical DPPH (84,08%), ficando atrás dos mostos de uva, toranja e laranja (93,66, 93,47 e 91,22% respectivamente). O fermentado alcoólico de

carambola teve uma redução de 25,77 pontos percentuais em relação ao mosto da fruta, sendo capaz de sequestrar 58,31% do radical DPPH, menor valor encontrado entre os vinhos de fruta estudados. A concentração de compostos fenólicos do vinho de carambola foi de 31,64 mg/100mL, uma redução de 83,79% em relação à etapa anterior. A acetificação resultou em um produto com uma concentração um pouco menor de compostos fenólicos totais (28,16 mg/100mL) que o fermentado alcoólico que o originou, no entanto, este vinagre foi capaz de um maior sequestro do radical DPPH, alcançando a marca de 69,53%, o equivalente a 1,84 µg de ácido gálico/mL.

Em seu estudo com resíduo de carambola, Shui e Leong (2006) verificaram alta correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico de sucos e extratos da fruta ($R^2 = 0,9796$), colocando os polifenóis como compostos majoritários no que se refere ao sequestro de radicais livres nos produtos obtidos. No presente trabalho, quando o conteúdo fenólico e o sequestro do radical DPPH na matéria prima e nos fermentados alcoólico e acético de carambola são correlacionados, encontra-se um R^2 de 0,7971. O aumento na atividade antioxidante ao mesmo tempo em que houve queda do conteúdo fenólico total resultou nesta baixa correlação. Tal fato poderia ser explicado considerando que os compostos fenólicos totais do vinagre, mesmo que em menor concentração, apresentem maior capacidade de sequestro de radicais que os presentes no fermentado alcoólico. Ou ainda, que o vinagre tenha em sua constituição outros compostos com capacidade antioxidante, não somente compostos fenólicos. Os processos fermentativos pelos quais a fruta passou para originar os fermentados alcoólico e acético causaram alterações quantitativas, mas principalmente qualitativas nos compostos relacionados à atividade antioxidante.

Na sequência, o mosto de toranja apresentou o segundo maior teor de compostos fenólicos (118,15 mg/100mL) e sequestro de 93,47% do radical DPPH, resultado próximo ao de uva, o maior valor atingido (95,66%). A produção do vinho de toranja resultou numa queda de 46,86% no teor de fenólicos, isto é, 62,82 mg/100mL, sendo esta a maior concentração entre os fermentados produzidos. Apesar de obter a maior concentração de fenóis totais, o vinho de toranja sequestrou 77,32% do radical DPPH, valor

inferior ao verificado nos vinhos de uva (94,04%), maçã (89,81%), e laranja (82,16%). No vinagre de toranja, apesar de um teor discretamente menor de compostos fenólicos (60,88 mg/100mL), houve um aumento de 9,3 pontos percentuais no sequestro do radical DPPH, mostrando mais uma vez que a atividade antioxidante não se deve apenas ao conteúdo total de fenóis, devendo ser considerados tanto o tipo de composto fenólico presente quanto outros compostos de natureza distinta.

O mosto preparado com a polpa integral de laranja utilizada no processo, como dito anteriormente, figurou entre as três matérias-primas com maior capacidade de sequestro do radical DPPH (91,22%, equivalendo a 2,32 μ g de ácido gálico/mL). Seu conteúdo fenólico total, de 51,5 mg/100mL diferiu bastante do encontrado no fermentado alcoólico produzido (39,76 mg/100mL), mostrando uma variação negativa de quase 23%. O vinho de laranja, apesar da menor variação, teve também menor capacidade de sequestrar o radical DPPH que a polpa usada na sua produção (82,16% de sequestro). O fermentado acético, no entanto, retornou a valores bem próximos aos obtidos no mosto preparado com a polpa integral, com 50,49 mg/100mL de compostos fenólicos totais e 92,02% de sequestro do radical DPPH. Esses resultados fizeram com que a produção de vinagre de laranja apresentasse a maior correlação entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante ao longo do processo (0,9887 e R^2 de 0,9774). A alta correlação entre os resultados pode indicar que os compostos fenólicos sejam os principais responsáveis pela atividade antioxidante nestes produtos (ALONSO et al., 2004, VERZELLONI; TAGLIAZUCCHIB; CONTE, 2007).

O fermentado alcoólico de kiwi, apesar de possuir conteúdo fenólico cerca de 50% maior que mosto usado em sua produção, apresentou menor capacidade de sequestrar o radical DPPH, diminuindo de 72,91% de sequestro no mosto para 69,15% no vinho. Já o fermentado acético, a exemplo do que foi obtido em outras matérias-primas, apresentou maior conteúdo fenólico (55,97 mg/100mL) e também maior capacidade antioxidante (96,34%, equivalendo à atividade de 2,44 mg de ácido gálico por 100mL). O poder de sequestro do radical DPPH do fermentado acético de kiwi só foi menor que o do vinagre de uva (98,31%). A baixa correlação entre fenóis e atividade antioxidante obtida ao longo do

processo sugere novamente a produção de compostos com atividade antioxidante que sejam de outra natureza química, ou ainda, de fenólicos com maior capacidade antioxidante.

O fermentado alcoólico de maçã, em comparação com o mosto de frutas usado em sua fabricação, apresentou maior conteúdo fenólico (57,54 contra 40,61 mg EAG/100mL) e também maior capacidade de sequestrar o DPPH (89,81% contra 83,62%). O processo de acetificação, no entanto, teve efeito inverso, pois o vinagre produzido apresentou redução de 18% no sequestro do radical (73,66%) e de 41,5% no conteúdo fenólico (33,62 mg EAG/100mL). Andlauer, Stumpf e Fürst (2000) encontraram resultados similares quando compararam o conteúdo fenólico de vinagres de maçã com as sidras que os originaram. No referido trabalho, a diminuição do teor de fenóis totais causada pelo processo de acetificação da sidra foi de 32% em um ensaio e 43% em outro, resultando em vinagres com 41,6 e 46,2 mg EAG/100mL. Entre os vinagres produzidos, o de maçã foi o que apresentou a segunda menor capacidade de sequestro do radical DPPH, ficando na frente apenas do produto obtido da carambola. Apesar disso, vários autores relatam que o consumo de vinagre de maçã pode estar ligado a outros benefícios como o efeito hipotensivo (FUJITA, 1967; KONDO et al., 2001; MUTO, IGARASHI, 2002; KAJIMOTO et al., apud ABE et al., 2007) e mais recentemente a descoberta no produto de uma molécula glicosilada com efeito antitumoral (ABE et al., 2001, ABE et al., 2007).

Na comparação entre o mosto e o fermentado alcoólico de maçã, o aumento na capacidade de sequestrar o radical DPPH foi acompanhado por um acréscimo no conteúdo fenólico. E na acetificação os dois parâmetros apresentaram redução. O alto coeficiente de correlação entre os resultados (0,9328) indica uma forte ligação entre a atividade anti-radicais *in vitro* e o conteúdo total de fenóis nas amostras avaliadas.

Não houve diferença entre o conteúdo fenólico total do mosto, vinho e vinagre de maracujá (38,45 ± 1,00, 37,64 ± 3,49 e 34,09 ± 0,79 mg EAG/100mL, respectivamente), mostrando que esses compostos se mantiveram em um mesmo nível quantitativo. Em relação ao sequestro do radical DPPH, verificou-se um pequeno aumento dessa característica no mosto, comparada ao fermentado alcoólico, e a manutenção dos mesmos

níveis no vinagre obtido. O produto final apresentou valores de compostos fenólicos e de atividade antioxidante bem próximos aos do vinagre de maçã.

O mosto de toranja apresentou o segundo maior teor de compostos fenólicos entre todos os substratos estudados (118,15 mg EAG/100mL) e a maior capacidade antioxidante ($93,47 \pm 1,06\%$ de sequestro do radical DPPH), juntamente com o mosto de uva. A alta atividade antioxidante e o elevado conteúdo fenólico da toranja vêm recebendo a atenção de vários estudos nos últimos anos (RAPISARDA et al., 1999, MAJO et al., 2005, KELEBEK, 2009). Na produção do vinho de toranja houve uma queda de 47% no conteúdo fenólico (62,82 mg EAG/100mL) e de 17% na capacidade de sequestrar o radical DPPH (77,32%). No processo de acetificação, a pequena queda no teor de fenólicos (60,88 mg EAG/100mL) não se relacionou com a capacidade antioxidante, que teve aumento de 12%, atingindo 86,62% de sequestro do radical DPPH.

Nos processos de fermentação alcoólica e de acetificação do mosto de uva foram verificadas reduções no conteúdo fenólico total. A primeira redução foi de 18,5% (56,14 mg EAG/100mL no mosto e 45,74 mg EAG/100mL no fermentado alcoólico) e segunda de 24,8% (vinagre com 34,42 mg EAG/100mL). No trabalho que estudou a influência do processo de acetificação na composição fenólica de vinagres feitos a partir sidra, vinho branco e vinho tinto, Andlauer, Stumpf e Fürst (2000), também observaram queda no conteúdo fenólico ao estudarem os processos de produção de vinagres de uva. No caso da acetificação do vinho tinto, foi possível verificar não só a redução do conteúdo fenólico total (método Folin-Ciocalteu), como também da concentração de compostos individuais, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Apesar da queda na concentração de compostos fenólicos no processamento da polpa de uva, nenhuma matéria-prima estudada superou sua capacidade antioxidante nas etapas avaliadas. Comparando o mosto de uva e o seu vinho, a capacidade de sequestrar o radical DPPH se manteve ($93,66 \pm 0,88\%$ no mosto e $94,04 \pm 0,49\%$ no vinho) apesar de um pequeno aumento nos valores médios. O vinagre, obtido a partir do vinho, apresentou

atividade antioxidante levemente maior que este, sendo capaz de sequestrar 98,31% do radical DPPH, nas condições do estudo.

4.5 Análises de Agrupamento Hierárquico e de Componentes Principais

Na Figura 7, está representado o dendrograma obtido utilizando as variáveis: extrato seco total, extrato seco reduzido, açúcares totais, cinzas, grau alcoólico total, acidez volátil, acidez total, cloretos, dióxido de enxofre, pH, sequestro do radical DPPH, fenóis totais, acetaldeído, acetato de etila, metanol, diacetil, acetato de butila, isobutanol e hexanol. Para essa análise foram consideradas apenas as amostras de vinagre, uma vez que foram utilizados resultados específicos para a caracterização destes produtos.

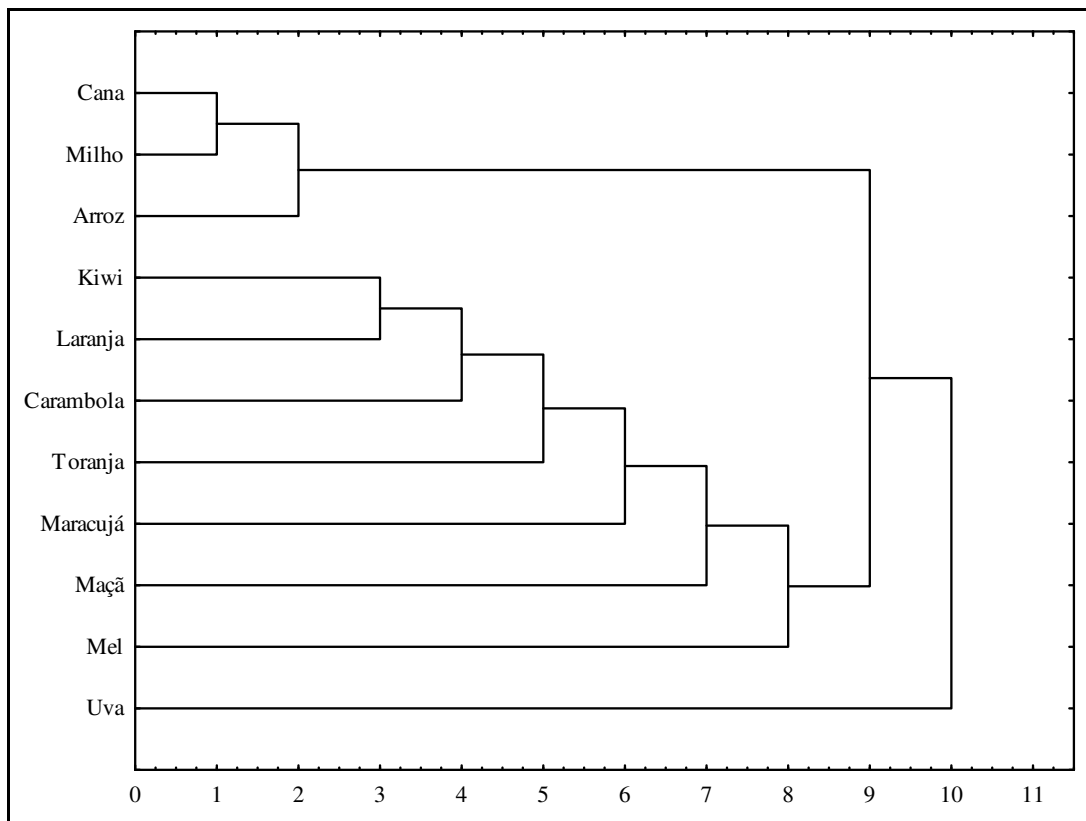


Figura 7: Dendrograma obtido da análise de agrupamento hierárquico das onze amostras de vinagre utilizando dezenove variáveis: extrato seco total, extrato seco reduzido, açúcares totais, cinzas, grau alcoólico total, acidez volátil, acidez total, cloretos, dióxido de enxofre, pH, sequestro do radical DPPH, fenóis totais, acetaldeído, acetato de etila, metanol, diacetil, acetato de butila, isobutanol, hexanol.

A análise de agrupamento hierárquico é uma coleção de diferentes algoritmos que agrupam objetos e costuma ser usada quando não se possui nenhuma hipótese *a priori* sobre a estrutura ou comportamento dos dados. No dendrograma, obtido por meio desta análise, quanto menor a distância entre os pontos, maior será a semelhança entre as amostras (MOITA NETO; MOITA, 1998).

Traçando uma linha de corte entre os pontos 7 e 8 do dendrograma, evidencia-se a formação de quatro grupos, sendo um formado pelo vinagre de uva, outro pelo vinagre de mel, um terceiro pelos demais vinagres de frutas e finalmente o grupo formado pelos vinagres de matérias-primas destiladas.

A partir da análise da figura, pode-se observar que o vinagre de uva apresentou uma evidente diferença em relação aos demais, não podendo ser agrupado com nenhum deles. Várias particularidades deste produto foram evidenciadas durante a discussão dos resultados analíticos, e a ferramenta estatística do agrupamento hierárquico confirma a distinção do produto sem qualquer subjetividade que possa ter influenciado a interpretação dos dados. O vinagre de mel, único produto de origem animal utilizado no estudo se separou das demais amostras no dendrograma, mas não de maneira tão evidente quanto o de uva.

Outro grupo bastante distinto e previamente reunido pela discussão dos resultados foi o formado pelos vinagres de cana, milho e arroz. Os produtos obtidos a partir de cachaça e etanol de milho formaram um subgrupo dentro dos vinagres feitos com matérias-primas destiladas, sendo estes produtos os que apresentaram a menor distância no dendrograma. O agrupamento desses vinagres ocorreu, provavelmente, pela similaridade dessas amostras no que se refere à concentração dos compostos voláteis estudados e à capacidade antioxidante.

Entre os demais vinagres de frutas foi possível observar a semelhança entre os produtos de kiwi e laranja, segundo as variáveis estudadas, dada à proximidade das amostras na análise de agrupamento. Já o vinagre de maçã apresentou alguma distinção

entre os vinagres de frutas, pela análise do dendrograma. Se a linha de corte for feita entre os pontos 6 e 7 teremos esse produto separado dos demais, que formariam um grupo de frutas tidas como não convencionais para a produção de vinagre. Essa divisão, no entanto, parece ser tendenciosa quando se visualiza a análise dos componentes principais (ACP), apresentada a seguir.

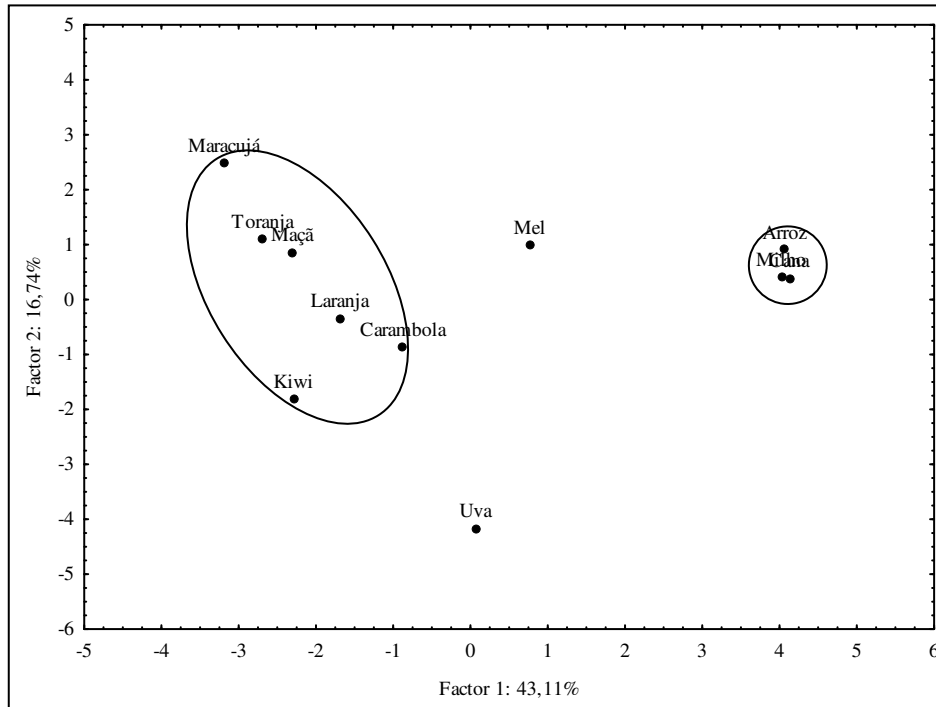


Figura 8: Gráfico de *Scores* dos vinagres produzidos, usando as duas componentes principais (CP1 versus CP2).

A Análise de Componentes Principais, vista na Figura 8 mostra que 43,11% da variação ocorrida entre as amostras foi explicada pelo primeiro eixo e 16,74% explicada pelo segundo eixo. Juntas, as Componentes Principais 1 e 2 explicaram 59,85% da variação ocorrida entre as amostras. Na primeira componente (CP1) os maiores pesos estão em grau alcoólico (0,749), acidez volátil (0,633) e acidez total (0,606) e na segunda componente (CP2) os maiores pesos estão em cloretos (0,694) e acetaldeído (0,506). As descrições dos pesos das componentes principais 1 e 2 para as variáveis e amostras estudadas encontram-se nas Tabelas A1 e A2, do anexo.

Os vinagres de matérias-primas destiladas ficaram bem próximos na Figura 6, havendo quase que uma sobreposição entre os pontos referentes aos produtos de milho e cana, reforçando ainda mais a similaridade vista entre essas amostras ao longo da discussão dos resultados. Em outra região do gráfico pode-se ver os vinagres produzidos com maracujá, toranja, maçã, laranja, carambola e kiwi formando um grupo próximo, mas como localizações bem definidas. A semelhança do que foi visualizado no dendrograma, os vinagres de mel e uva se distanciaram dos demais, não podendo ser agrupados com nenhuma das amostras.

4.6 Ingestão de compostos fenólicos pelo consumo de vinagre

A Tabela 6, abaixo, mostra os resultados obtidos das determinações de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e da capacidade antioxidante em relação ao radical DPPH nos vinagres após diluição para atingir 4,0% de acidez total, conforme a legislação brasileira.

Tabela 6. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da porcentagem de sequestro do radical DPPH, do sequestro equivalente ao ácido gálico e dos compostos fenólicos totais dos vinagres padronizados para consumo.

Amostra	% Sequestro do Radical DPPH	Atividade antioxidante eq. Ácido Gálico (µg/mL)	Fenóis Totais (mg Ácido Gálico/100mL)
Toranja	60,61 ± 4,1216 (0,0680)	1,64 ± 0,0912 (0,0554)	40,52 ± 0,4077 (0,0134)
Kiwi	49,25 ± 1,1297 (0,0229)	1,39 ± 0,0250 (0,0179)	29,30 ± 0,0933 (0,0048)
Carambola	49,25 ± 4,3919 (0,0892)	1,39 ± 0,0972 (0,0697)	16,79 ± 0,4766 (0,0178)
Uva	48,03 ± 0,5111 (0,0052)	1,37 ± 0,0113 (0,0046)	16,92 ± 0,7020 (0,0220)
Maracujá	46,81 ± 2,4812 (0,0530)	1,34 ± 0,0549 (0,0410)	25,37 ± 1,9669 (0,0775)
Laranja	38,03 ± 2,1683 (0,0570)	1,15 ± 0,0480 (0,0419)	24,09 ± 0,0971 (0,0040)
Maçã	21,45 ± 2,0602 (0,0961)	0,78 ± 0,0456 (0,0586)	27,53 ± 0,3107 (0,0113)
Milho	17,37 ± 1,7736 (0,1021)	0,69 ± 0,0392 (0,0570)	4,63 ± 0,0712 (0,1137)
Mel	14,71 ± 0,8991 (0,0611)	0,63 ± 0,0199 (0,0316)	20,22 ± 0,1886 (0,0093)
Cana	12,11 ± 1,2676 (0,1047)	0,57 ± 0,0280 (0,0491)	9,64 ± 0,2403 (0,0909)
Arroz	6,01 ± 2,5365 (0,4221)	0,44 ± 0,0561 (0,1285)	4,59 ± 0,1429 (0,2442)

Os vinagres, agora padronizados para consumo, foram apresentados na Tabela 6 em ordem decrescente quanto à capacidade antioxidante medida pelo sequestro do radical DPPH. Desconsiderando as etapas do processamento, o vinagre de toranja chegaria ao consumidor com o melhor perfil do ponto de vista funcional, apresentando a maior capacidade de sequestrar o radical DPPH (60,61%) e também com o maior conteúdo fenólico total (40,52 mg EAG/100mL).

Em um segundo grupo, os vinagres de kiwi, carambola, uva e maracujá apresentaram valores de sequestro do radical DPPH de 49,25, 49,25, 48,03 e 46,81%, respectivamente. Apesar dos mesmos valores de capacidade antioxidante dos vinagres de kiwi e carambola, os valores de fenóis totais são bem distintos o que mostra que não há relação direta entre essas parâmetros quando se consideram matérias-primas diferentes.

Os vinagres de matérias-primas destiladas e mel chegariam ao consumidor com os menores valores de compostos fenólicos totais e de sequestro do DPPH. Esses resultados eram esperados para os vinagres de arroz, cana e milho. No caso do vinagre de mel não foram encontradas referências na literatura que possa servir como base de comparação.

Do ponto de vista de aporte de compostos funcionais na dieta, o consumo de vinagre é relevante. Considerando-se que o produto é usado rotineiramente como tempero de verduras e que um indivíduo consome cerca de 5 mL de vinagre por refeição, a quantidade de compostos fenólicos ingerida usando os vinagres produzidos neste trabalho ficaria entre 0,23 e 2,03 mg. Jang e colaboradores (1997) relataram que a ingestão de 25 a 50 mg de compostos fenólicos por dia proporcionou menor risco de doenças do coração. Silberberg (2006), citado por Horst e Lajolo (2009) supõe que a ingestão dietética mínima de polifenóis, em um dia, seja de 1g. Estes compostos têm sido considerados importantes por diversas características além da capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, como a modulação da atividade de algumas enzimas e o seu potencial antibiótico, antialérgico, anti-inflamatório e anticarcinogênico.

Enfim, os dados e análises levam ainda a outras discussões de ordem cultural. Os vinagres comercializados no Brasil são, em sua maior parte, produzidos a partir de etanol de cana. Afora isso, o senso comum também insiste na ideia de que bons vinagres, principalmente aqueles com finalidade terapêutica, são aqueles produzidos a partir de arroz ou de maçã. Tem-se, então, uma cultura que preza os vinagres de baixo custo ou então aqueles cujas referências estão no mundo oriental ou na Europa. Os dados coletados revelam que vinagres de frutas apresentam número e volume superiores de elementos químicos benéficos à saúde e ao sabor do produto. E tais vinagres podem ser obtidos a partir de matérias-primas muitas vezes descartadas pelo mercado. Sabor, saúde, economia e respeito ao meio ambiente parecem ser, por seu turno, aspectos suficientemente atraentes para um processo de mudança em termos de compreensão do valor do vinagre na sociedade brasileira contemporânea.

5 Conclusões

Vinagres originários de matérias-primas destiladas (cachaça, etanol de arroz e etanol de milho) apresentaram menores valores de compostos fenólicos totais e de sequestro do DPPH quando comparados com os produzidos a partir de frutas (carambola, kiwi, laranja, maçã, maracujá, toranja e uva).

A composição química característica de cada tipo de fruta teve grande influência no conteúdo fenólico e na atividade antioxidante, tanto nos fermentados alcoólicos quanto nos produtos de fermentação acética.

Os vinagres de etanol de arroz, cachaça e etanol de milho apresentaram teores detectáveis de compostos fenólicos totais, apesar da ausência desses compostos em suas matérias-primas, pelo método de Folin-Ciocalteu. Estes compostos funcionais foram produzidos pelas bactérias na etapa de fermentação acética. O grande aumento na capacidade de sequestro do radical DPPH nestes vinagres indica correlação entre os fenólicos e a atividade antioxidante dos produtos.

O mosto, o fermentado alcoólico e o vinagre de uva apresentaram os valores mais altos de sequestro relativo do radical DPPH em comparação com as outras amostras, apesar de não possuírem os maiores teores de compostos fenólicos. O vinagre de uva se diferenciou claramente dos demais no agrupamento hierárquico que considerou dezenove variáveis dos produtos.

Quando padronizado para o consumo, concentração de 4% (p/v) em acidez total, o vinagre de toranja superou os demais produtos no que se refere ao conteúdo fenólico total e à capacidade antioxidante relativa ao radical DPPH.

A partir de estatística multivariada em relação aos resultados das determinações químicas realizadas foi possível separar os vinagres produzidos em quatro grupos: os feitos com matérias-primas destiladas (arroz, milho e cachaça), o produzido com mel, o

fermentado da uva e os obtidos a partir de carambola, kiwi, laranja, maçã, maracujá e toranja.

O consumo rotineiro de vinagres, especialmente os feitos a partir de frutas, contribui na ingestão diária de compostos fenólicos preconizada na literatura científica.

Frutas que seriam rejeitadas por não apresentarem padrão para consumo direto podem dar origem a vinagres de excelente qualidade e atributos funcionais desejáveis.

Fazem-se necessários estudos mais aprofundados sobre a identificação das moléculas bioativas formadas na produção de vinagres, além da confirmação da atividade dessas espécies químicas na proteção celular.

6 Referências Bibliográficas

ABE, K., ARAI, R., KUSHIBIKI, T., SASAKI, J. I., MATSUE, H. Antitumor-active, neutral, medium-sized glycan from apple vinegar. **Food Science Biotechnology**, 10, 534–538, 2001.

ABE K., KUSHIBIKI T., MATSUE H., FURUKAWA K., MOTOMURA S. Generation of antitumor active neutral medium-sized alpha-glycan in apple vinegar fermentation. **Bioscience Biotechnology Biochemistry Sep**;71(9):2124-9, 2007

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A. & AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, 22, 1041-1047, 2002.

ALONSO, A.M.; CASTRO, R.; RODRÍGUEZ, M. C.; GUILLÉN, 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

ANDLAUER W., STUMPF C., FÜRST P. Influence of the acetification process on phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Aug;48(8):3533-6, 2000

AQUARONE, E.; ZANCANARO JR., O. Vinagres. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. (ed.). **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1990. p.105-123.

ARAÚJO, J.M. **Química de Alimentos – Teoria e Prática**. Editora UFV Universidade Federal de Viçosa, 2 edição – 2006.

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

ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food Chemistry Toxicology**. Vol 32, n 7, pp 671-683, 1994.

ASAI, T. **Acetic acid bacteria classification and biochemical activities**. Tokyo: University of Tokyo, 1968. 343 p.

ATURKI, Z., BRANDI, V., SINIBALDI, M. Separation of flavanone-7-O-glycoside diastereomers and analysis in citrus juices by multidimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, 5303, 2004.

BASTOS, D. C. A cultura da carambola. **Revista Brasileira de Fruticultura**. vol.26, n.2, p. 193, 2004.

- BEATTI, D.S. Bioenergética e metabolismo oxidativo In: DELVIN, T.M. (Coord.) **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda 1^a Ed., 2003.
- BELLINI, M. Z. **Caracterização bioquímica dos vinagres brasileiros**. Campinas, 2006. 86 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.
- BILSKA, V. Plasmid systems in acid bacteria of genus *Acetobacter*. **Biologia** - (Bratislava). 2003; 58(3): 321-326.
- BLINDER, F.; VOGES, E.; LAUGE, P. The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits. **Food Additives Contaminants**, v. 5, p. 343-51, 1988.
- BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G. Classification of Brazilian vinegars according to their ¹H NMR spectra by pattern recognition analysis. **LWT - Food Science and Technology** vol. 42 p. 1455–1460, 2009
- BORS, W., W. HELLER, W. MICHAEL, SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in enzymology**, 186: 343-355, 1990.
- BOUIS, H. E.; CHASSY, B. M.; OCHANDA, J. O. Genetically modified food crops and their contribution to human nutrition and food quality. **Trends in Food Science & Technology** v. 14 p. 191–209, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 24, de 08 de setembro de 2005. Aprova o manual operacional de bebidas e vinagres. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de setembro de 2005, Seção 1, p. 11.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 36, de 14 de outubro de 1999. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para fermentados acéticos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 15 de outubro de 1999, Seção 1, p. 76.
- BURATTI, S., BENEDETTI, S., COSIO, M. S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. **Talanta**, 71, 1387–1392, 2007
- CEREZO, A. B.; TESFAYE, W.; SORIA-DÍAZ, M. E.; TORIJA, M. J.; MATEO, E.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. **Journal of Food Composition and Analysis** v. 23 p. 175–184, 2010.
- CETKOVIC G.; CANADANOVIC-BRUNET J.; DJILAS S.; SAVATOVIC S.; MANDIC A.; TUMBAS V. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. **Food Chemistry**, 109 (2), pp. 340-347, 2008

- CHAN, H. T. Passion fruit, papaya and guava juices. In: NAGY, D.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E. **Fruit Juice Processing Technology**. Auburndale: Agscience Inc, p.334-348, 1993
- 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**, 48, 70-77, 2000.
- CHINNAWIROTPISAN, P.; THEERAGOOL, G.; LIMTONG, S.; TOYAMA, H.; ADACHI, O.; MATSUSHITA, K. Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while dad-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. **Journal of Bioscience and Bioengineering** vol. 96, n 6, 564-571, 2003.
- COCCHI, M.; LAMBERTINI, P.; MANZINI, D.; MARCHETTI, A.; ULRICI, A. determination of carboxylic acids in vinegar and in aceto balsâmico tradizionale di modena by HPLC and GC methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002; 50(19): 5255-5261.
- DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; GOMÉZ-CORDOVÉS, C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. **Food Chemistry**. V. 93 p. 325–330, 2005.
- DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Cítricos**. Zaragoza: Acribia, 1999, 283 p.
- DHAWAN, K; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update **Journal of Ethnopharmacology** 94, 1–23, 2004
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NOVOA, A. V.; LINARES, A. F.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) Juice **Plant Foods for Human Nutrition** 61: 187–192, 2006.
- DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWINGS, J. Family VI. *Acetobacteraceae*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p.267-277, 1984.
- DEL SIGNORE, A. Chemometric analysis and volatile compounds of traditional balsamic vinegars from Modena. **Journal of Food Engineering**. 50 (2001) 77-90
- EBNER, H.; FOLLMANN, H.; SELLMER, S. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. VCH Verlagsgesellschaft, 1996, Vol A27, Germany.
- ESCARPA A., GONZALEZ M.C. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties **Journal of Chromatography A**, 823 (1-2), pp. 331-337, 1998
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Tecnologia da produção de milho**. 1. ed. Piracicaba, SP: Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz", 1999. 243 p.
- FRINGS MICRODYN DO BRASIL. **Arquivos técnicos em fermentação submersa**. Piracicaba, 1996. (mimeogr.).

- GALIZIA, M.S.; WAITZBERG, D.L. Mecanismo de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica** 2001; 16:79-89.
- GARCÍA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, vol. 84, p.13-18, 2004
- GARCÍA-PARRILLA, M. C.; GONZÁLEZ, G. A., HEREDIA, F. J.; TRONCOSO, A. M. Differentiation of wine vinegars based on phenolic composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 45 p. 3487-3492, 1997
- GARCIA-PARRILLA, M.C.; HEREDIA, F.J., TRONCOSO, A.M. Sherry wine vinegars: phenolic composition changes during aging. **Food Research International**, 32: 433-440, 1999.
- GEUM-SOON-OH; KIL-JIN-KANG; YEONG-PYO-HONG; YEOUNG-SUN-AN; HYANG-MI-LEE. Distribution of organic acids in traditional and modified fermented foods. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**. 2003; 32(8): 1177-1185.
- GHELDOLF, N. AND N.J. ENGESETH. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50:3050-3055, 2002.
- GHOMMIDH, C.; CUTAYAR, J.M.; NAVARRO, J.M. Continuous production of vinegar. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 13-18, 1986.
- GUERRA, J. B.; ARAÚJO, R. A. C.; PATARO, C., FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 106-111, 2001.
- HALL, C. Sources of natural antioxidants : oilseeds , nuts , cereals , legumes , animal products and microbial sources. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: Practical applications**. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited. 2001. Cap. 9, p. 159-198.
- HAMMES, W. P.; BRANDT, M.J.; FRANCIS, M. K.L.; ROSENHEIM, J.; SEITTER, M.F.H.; VOGELMANN, S.A. Microbial ecology of cereal fermentations. **Trends in Food Science & Technology**, p. 1-8, 2005.
- HLEBOWICZ, J.; DARWICHE, G.; BJÖRGELL, O.; ALMÉR, L. Effect of apple cider vinegar on delayed gastric emptying in patients with type 1 diabetes mellitus: a pilot study. **BMC Gastroenterology**, 7:46, 2007.

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 & Wilkins, 1994.

HORIUCHI, J. I.; KANNO, T.; KOBAYASHI, M. New vinegar production from onions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 88, p. 107-109, 1999

IJIMA, K.; YOSHIKUNI, M.; OUCHI, Y. Effect of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell function—molecular mechanism of the ‘French paradox’. **Mechanisms of Ageing and Development**, vol.123, p. 1033–1039, 2002

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística - **Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do biênio 2008-2009** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>
Acessado em: 16 nov. 2010.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W. W.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; DOUGLAS-KINHORN, A.; METHA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 257, p.218220, 1997.

KASHIMA, Y.; IJIMA, M.; OKAMOTO, A.; KOIZUMI, Y.; UDAKA, S.; YANAGIDA, F. Purification and characterization of intracellular esterases related to ethylacetate formation in *Acetobacter pasteurianus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Tokyo, v. 85, n. 6, p. 584-588, 1998.

KASHIMA, Y.; IJIMA, M.; NAKANO, T.; TAYAMA, K.; KOIZUMI, Y.; UDAKA, S.; YANAGIDA, F. Role of intracellular esterases in the production of esters by *Acetobacter pasteurianus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Tokyo, v. 89, n. 1, p. 81-83, 2000.

KELEBEK, H.; SELLI, S.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan **Microchemical Journal** 91, 187–192, 2009.

LAJOLO, F. M. ; HORST, M. A. . Biodisponibilidade de compostos bioativos em alimentos. In: COZZOLINO, S. M. F. (Org.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3 ed. São Paulo: Ed. Manole, 2009, v. 1, p. 772-807.

LIMA, M. A. C.; GARCIA, R. O.; MARTINS, G. S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, vol.24, n.1, pp. 73-77, 2001.

LIMA, U. A.; BORZANI, W.; AQUARONE, E.; SCHIMIDELL (Coordenadores) **Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541 p. (Biotecnologia Industrial, v.2)

- LIU, F.; HE, Y.; WANG, L. Determination of effective wavelengths for discrimination of fruit vinegars using near infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Analytica Chimica Acta**, vol. 615, p. 10-17, 2008.
- LU, S.F.; LEE, F.L.; CHEN, H.K. A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp. 114-2. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p.55-62, 1999.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- MAJO, D., GIAMMANCO, M., LA GUARDIA, M., TRIPOLI, E., GIAMMANCO, S., FINOTTI, E. Flavanones in citrus fruit: structure-antioxidant activity relationships. **Food Research International**. v. 38, p. 1161 – 1166, 2005.
- MALDONADO, O.; ROLZ, C.; CABRERA, S. S. Wine and vinegar production from tropical fruits. **Journal of Food Science**. vol. 40(2) p. 262-265, 1975.
- MARQUES, F. P. P. **Características físico-químicas, nutricionais e sensoriais de vinagres de diferentes matérias-primas**. 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- MARTINEZ-CAYUELA, M. Oxygen free radicals and human disease. **Biochimie**.v.77, p. 147-161, 1995.
- MEDINSKY, M. A.; DORMAN, D. C. Recent developments in methanol toxicity. **Toxicology Letters**, v. 82-83, p. 707-711, 1995.
- MEINHART, A.D.; BIZZOTTO, C.S.; BALLUS, C.A.; RYBKA, A.C.P.; SOBRINHO, M.R.; CERRO-QUINTANA, R.S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H.T. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p. 2188-2193, 2010.
- MIYAKAMA, Y; MIYAGAWA, F., NISHIYAMA, Y., MURA, K., TOKUE, C. Antioxidative smoke flavor extration in wood vinegar prepared from drift wood. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**. 2003; 50 (11): 530-536.
- MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.
- MORALES, M.L.; GONZALEZ G.A.; TRONCOSO, A.M., Íon-exclusion chromatographic determinaton of organic acids in vinegars. **Journal of Chromatographic A**, 822, 1998, 45-51.

MORALES, M.L.; TESFAYE W.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; CASAS, J. A.; TRONCOSO, A. M. Evolution of the aroma profile of sherry wine vinegars during an experimental aging in wood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Seville, v.50, p. 3173-3178, 2002.

MORALES, M.L.; BENITEZ, B.; TRONCOSO, A. M. Accelerated aging of wine vinegars with oak chips: evaluation of wood flavour compounds. **Food Chemistry**, Seville, v.88, p.305-315, 2004.

MORELLO, M. J.; SHAHIDI, F.; HO, C. Free radicals in food: Introduction. In _____ **Free Radicals in Food: Chemistry, Nutrition, and Health Effects** Washington, D.C.: ACS Symposium Series 807, American Chemical Society, 2002. Cap. 1 p. 1-9.

MORETTO, E.; ALVES, R.F.; CAMPOS, C.M.T.; ARCHER, R.M.B.; PRUDENCIO, A. **Vinhos e vinagres: processamento e análises**. Florianópolis: Ed. UFSC, 1988. 168 p.

MORTON, J. F. **Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)**. In: _____ **Fruits of Warm Climates**. Florida Flair Books, 1987. p. 293-300.

NATERA, R.; CASTRO, R.; GARCIA-MORENO, M.V.; HERNÁNDEZ, M.J.; GARCIA-BARROSO, C. Chemometric studies of vinegar from different raw materials and processes of production. **J. Agric. Food Chem.** 2003, 51, 3345-3351.

NISHIDAI, S.; NAKAMURA, Y.; TORIKAI, K.; YAMAMOTO, M.; ISHIHARA, N.; MORI, H.; OHIGASHI, H. Kurosu, a traditional vinegar produced from unpolished rice, suppresses lipid peroxidation in vitro and in mouse skin. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (Japan)**. 2000, v 64(9) 1909-1914.

NISPEROS-CARRIEDO, M. O.; SHAW, P. E. Comparison of volatile flavor components in fresh and processed orange juices. **J. Agric. Food Chem.** v. 38, p. 1048-1052, 1990.

NUCCI, T.A. **Cultura do kiwi**. Instituto Agronômico de Campinas. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 28 p.

NÚÑES, V.; MONAGAS, M.; GOMES-CORDOVÉS, M.C.; BARTOLOMÉ, B. *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. **Postharvest Biology and Technology**, Madrid, v. 31, p. 69-79, 2004.

OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. 2001. 135f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

OLIVEIRA, T. T.; ROSA, C. O. B.; STRINGHETA, P. C.; VILELA, M. A. P. Ação antioxidante dos flavonóides. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos**

Funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Rio de Janeiro: Rubio Ltda, 2010, Cap. 04, p.59-78.

ORY, I.; ROMERO, L.E.; CANTERO, D. Modelling the Kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 189-193, 1998.

PALACIOS, V.; VALCÁRCEL, M.; CARO, I.; PÉREZ, L. Chemical and biochemical transformations during the industrial process of sherry vinegar aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 4221-4225, 2002.

PEDDIE, H. A. B. Ester formation in brewery fermentations. **Journal of Institute of Brewing**, v. 96, p.327-331, 1990.

PRATI, P.; NOGUEIRA, J. N.; DIAS, C.T.S. Avaliação de carambola (*Averrhoa carambola* L.) dos tipos doce e ácido para o processamento de fruta em calda. **Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos**, v. 20, n.2, p.221-246. jul./dez. 2002.

RAPISARDA P., FABRONI S., PETEREK S., RUSSO G., MOCK H.-P. Juice of new citrus hybrids (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.×*C. sinensis* L. Osbeck) as a source of natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 117 n. 2, p. 212-218, 2009.

RIZZON, L. A. ; MENEGUZZO, J . **Elaboração de Vinagre**. Bento Gonçalves, 2002. (Documentos) - Embrapa Uva e Vinho.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Concentração de ácido tartárico dos vinhos da serra gaúcha. **Cienc Rural** vol 31 no 5 Santa Maria Sept/Oct. 2001.

SAEKI, A.; TANIGUCHI, M.; MATSUSHITA, K.; TOYAMA, H.; THEERAGOOOL, G.; LOTONG, N.; ADACHI, O. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 2, p. 317-323, 1997.

SALO. P.; NYKÄNEN, L.; SUOMALAINEM, H. Odor thresholds and relative intensities of of volatile aroma components in na artificial beverage imitating whisky. **Journal of Food Science**, v. 37, p. 394-398, 1972.

SANARICO, D.; MOTTA, S.; BERTOLINI, L.; ANTONELLI, A. HPLC Determination of organic acids in traditional balsamic vinegar of HPLC Determination of organic acids in traditional balsamic vinegar of reggio emilia. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**. 2003; 26(13): 2177-2187.

SANTOS, A. O.; PRADO, H., Análise de interações solo-planta-clima em zonas diferenciadas de área de cultivo de milho, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 1, p 101–106, 2002.

SANTOS JUNIOR, V. **Estudo das necessidades nutricionais de bactérias acéticas para a produção de ácido acético.** Campinas, 2009. 85 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.

SELLI, S.; CANBAS, A.; VARLET, V.; KELEBEK, H.; PROST, C.; SEROT, T. Characterization of the most odor-active volatiles of orange wine made from a turkish cv. kozan (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 227-234, 2008.

SHEN, Y.; JIN, L.; XIAO, P.; LU, Y.; BAO, J. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 106-11, 2009.

SHIMOJI, Y.; TAMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; NANDA, K.; NISHIDAI, S.; NISHIKAWA, Y.; ISHIHARA, N.; UENAKAI, K.; OHIGASHI, H., isolation and identification of dpph radical scavenging compounds in kurosu (Japanese unpolished rice vinegar), **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2002, 50, 6501-6503.

SHISHEHBOR, F.; MANSOORI, A.; SARKAKI, A. R.; JALALI, M. T.; LATIFI, S. M. Apple cider vinegar attenuates lipid profile in normal and diabetic rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 11, p. 2634-2638, 2008.

SHUI, G.; LEONG, L.P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 97, p. 277-284, 2006.

SHUI, G.; LEONG, L.P. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1022, p. 67-75, 2003.

SILVA F. T.; JARDINE, J. G.; MATTA, V. M. Concentração de suco de laranja (*Citrus sinensis*) por osmose inversa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, n1, jan./abr. 1998.

SOARES, S.E., Ácidos fenólicos como antioxidantes, **Revista de Nutrição**, 2002, v15 n1, Campinas, SP.

SPINOSA, W.A. **Utilização do amido da quirera de arroz na produção de vinagre.** Londrina, 1996. 93 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina.

SPINOSA, W.A. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre.** Campinas, 2002. 243 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.

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

SWINGS, J. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER K., H. (Ed.). **The Prokaryotes**. New York: Springer Verlag, 1992. p. 2.268-2.286.

TESFAYE, W.; MORALES, M.L.; BENÍTEZ, B.; GARCÍA-PARRILLA M.C.; TRONCOSO, A.M. Evolution of wine vinegar composition during accelerated aging with oak chips. **Analytica Chimica Acta**, Seville, v.513, p.239-245, 2004.

THOMAS, J.A. Estresse oxidativo e defesa contra oxidantes. In: SHILS, M.E.; OLSON, J. A.; SHIKE. M.; ROSS, A.C. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9 ed. São Paulo: Ed. Manole. 2003; p801-812.

VERZELLONI, E.; TAGLIAZUCCHIB, D.; CONTE, A. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. **Food Chemistry**. vol. 105, p. 564–571, 2007

VIRGILI, F.; SCACCINI, C. Cardiovascular disease and nutritional phenolics. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: Practical applications**. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited. 2001. Cap. 5, p. 87-96.

XU, Q.; TAO, W.; AO, Z. Antioxidant activity of vinegar melanoidins. **Food Chemistry**. vol. 102, p.841–849, 2007.

XU C., ZHANG Y., CAO L., LU J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, v. 119 n. 4, p. 1557-1565, 2010.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P. Genera and species in acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 125, p.15-24, 2008.

YAMAJI, K.; NAGANO, M.; MARUYAMA, I. Radical scavenging activity of kurozu (brewed rice vinegar) on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and its antioxidant effect on human low-density lipoprotein. **Journal of Society of Nutrition and Food Science**, v 54(2) 89-93, 2001.

ZANCANARO JR., O. **Otimização do processo lento de fermentação acética**. São Paulo, 1988. 69 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

7 ANEXO

Tabela A1. Descrição dos pesos das componentes principais 1 (CP 1) e componentes principais 2 (CP 2) para as variáveis estudadas.

Variáveis	CP1	CP2
Extrato Seco	-0,951	-0,023
Extrato Seco Red.	-0,887	-0,018
Açúcares	-0,648	-0,059
Cinzas	-0,879	-0,023
Grau Alcoólico	0,749	-0,261
Acidez Volátil	0,633	-0,575
Acidez Total	0,606	-0,620
Cloretos	0,003	0,694
SO ₂	-0,431	-0,432
pH	-0,913	-0,206
% DPPH	-0,870	-0,452
Fenóis Totais	-0,843	-0,180
Acetaldeído	-0,418	0,506
Acetato de Etila	0,364	-0,031
Metanol	-0,777	-0,157
Diacetil	0,022	-0,734
Acetato de Butila	0,222	-0,704
Isobutanol	0,292	-0,121
Hexanol	-0,665	-0,339

Tabela A2. Descrição dos pesos das componentes principais 1 (CP 1) e componentes principais 2 (CP 2) para as amostras de vinagre analisadas.

Amostras	CP1	CP2
Arroz	4,064	0,909
Cana	4,124	0,389
Milho	4,022	0,418
Mel	0,769	0,986
Carambola	-0,874	-0,857
Kiwi	-2,289	-1,806
Laranja	-1,690	-0,342
Maçã	-2,306	0,865
Maracujá	-3,190	2,493
Toranja	-2,694	1,112
Uva	0,063	-4,167