

ANÁLISE DO PROCESSO DE FABRICO DE VINAGRES

Vera Susana Clemente Costa

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos

Orientador: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Co-orientadora: Engenheira Ana Sofia Calado, Responsável pela Área Funcional de Investigação e Desenvolvimento da Gallo.

Júri

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação, do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação, do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com Agregação, do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Expresso o meu agradecimento sincero a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram positivamente para a realização desta tese.

Agradeço ao ISA, nomeadamente à professora Margarida Moldão, e à Gallo por terem tornado possível este estágio que contribuiu para a minha formação profissional.

Os meus agradecimentos ao professor Manuel Malfeito Ferreira especialmente pela disponibilidade, apoio e compreensão. Porque sei que deseja o melhor para o meu futuro profissional.

Agradeço também à Ana Calado pelo apoio, ajuda e compreensão, e a todos os membros da Victor Guedes que me auxiliaram na concretização desta tese. Agradeço ainda à professora Cristina Laranjeira pela ajuda e prestabilidade.

Os meus mais profundos e sinceros agradecimentos são dedicados aos meus pais e restante família, que sempre acreditaram nas minhas capacidades e empenho e dos quais sei que poderei sempre contar com apoio incondicional.

Agradeço relevantemente aos meus amigos por todo o apoio prestado e compreensão nos desabafos dos momentos mais atribulados, em especial à Catarina Santos e à Inês Naia.

Por fim, agradeço a todos os professores que contribuíram para toda a minha formação académica.

RESUMO

Pretendeu-se analisar todo o processo produtivo desde a chegada dos vinagres à fábrica produtora, passando pela fermentação acética, e mais afincadamente nas etapas posteriores, até ao armazenamento do vinagre acabado.

No âmbito da melhoria da qualidade dos vinagres, foram investigados os factores que degradam este produto, culminando em defeitos, nomeadamente, a presença de oxigénio e de temperaturas elevadas, em diferentes etapas do processo produtivo global.

Para tal, procedeu-se a uma primeira identificação e quantificação dos defeitos em amostras armazenadas, e posterior realização de ensaios que testaram o efeito destes potenciais factores degradativos, essencialmente em vinagres de vinho branco e tinto.

Os testes contemplaram a observação macroscópica e microscópica de vinagres engarrafados, assim como análises físico-químicas e microbiológicas, nomeadamente no que diz respeito à actividade das bactérias acéticas.

Os resultados mostraram que estes factores degradativos (o oxigénio e as temperaturas elevadas) são difíceis de controlar.

São portanto sugeridos estudos posteriores nesta matéria, bem como melhorias no âmbito dos resultados que foram conclusivos (os vinagres são degradados quando sujeitos ao oxigénio e a temperaturas elevadas), com vista na melhoria contínua da qualidade dos vinagres Gallo.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação acética, defeitos, temperatura, oxigénio e bactérias acéticas.

ABSTRACT

It was intended to analyse the entire production process from the arrival of the vinegar factory production, through acetous fermentation, and most actively in the advanced stages to the storage of the finished vinegar.

In attempt of the continuous improvement of the vinegars quality, there were investigated the factors that are capable to reduce the quality of this product, ended up in imperfections, like the presence of oxygen and high temperature, in different stages of the global productive process.

For this, it was proceeded to a first identification and quantification of defects in stored samples, and further studies which tested the effect of this potential derogatory factors, such as temperature and oxygen, essentially in white wine vinegar, and red wine.

The experiments included macroscopic and microscopic observation of bottled vinegars, as well as physico-chemical and microbiological analyses, mostly with regard to the activity of acetic bacteria.

The results appearances that this derogatory factors (oxygen and high temperature) are difficult to control.

Conclusive results revealed that the vinegar was spoil if exposed to oxygen and high temperatures.

KEYWORDS: Acetous fermentation, defects, temperature, oxygen and acetic bacteria.

EXTENDED ABSTRACT

In the food context, vinegar retains a great importance as a condiment, being still covered in numerous sauces.

Being a natural product, presents a certain microbiological vulnerability, which is influenced by many factors and may result in several defects.

The quality of a food product is a key attribute to the acceptability of this in markets.

This study is important to improve the production of vinegar "from farm to fork" process.

This work was developed in two distinct stages. In the first stage the production of vinegar process was analysed, to identify the features in different process steps. The acetic acid fermentation was analysed at the industrial unit that produces Gallo vinegars and then was made a regular monitoring of the bottling vinegars process, emphasising the stages of storage and filtration.

In the second stage, was studied the influence of the quality factors derogatory of vinegars, especially oxygen and temperature, but others too. The first relates to the effect of oxygen in vinegar, and the second one relates to the effect of temperature thereon. Although, other factors that may also be related to this study were focused two, in some way.

The wine, the raw material of the most Mediterranean vinegars, presents a mainly susceptibility to a microbial growth. Therefore, the focus of most of the tests in the second stage of this thesis was the wine vinegar, including those of white and red wine.

First it was necessary to prove the importance of evaluating what was expected to investigate, and for that vinegars were observed macroscopically for identification and quantification of defects in post-bottling and with some days.

Then, the same analysis was done in some vinegars under different conditions of temperature and oxygen. In outdoor storage was analysed the temperature of *liqua-bins* and the influence of storage conditions on pre-bottling. Next was studied the vinegar exposure to the oxygen and isolation, maintained at different temperatures, room temperature (~ 23 °C), at high temperature (~ 31, 5 °C) (to simulate pasteurization) and at refrigeration temperature (~ 4 °C).

Vinegar was also examined microscopically to identifying the defects in white wine vinegar dark coloured, white wine vinegar with a cellulose biofilm, and a deposit of particles in suspension in spumante vinegar.

Was studied the results of analytical determinations of SO₂, count of *Enterobacteriaceae*, lactic and acetic bacteria in vinegar exposed to different conditions, including temperature, filtration, and lifetime.

Evidence of evaluation analysis which aimed to compare various Gallo vinegars with a competitor brand and simultaneous characterization of these was still held.

The results showed that a very high level of factors involved in the whole process of vinegars production may adversely affect the product. So, further studies and truly representative batch samples are suggested in the future in order to obtain a higher vinegar quality than the one observed in the study.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	II
ABSTRACT	III
EXTENDED ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tipos de Vinagre, História e Mercados	1
1.2. Tecnologia de Produção de Vinagre	3
1.2.1. Acetificação	4
1.2.2. Método <i>Frings</i>	6
1.3. Microbiologia das Bactérias do Ácido Acético	9
1.3.1. A Matéria-prima Vinho	10
1.3.2. <i>Gluconacetobacter xylinus</i> – biofilme de celulose.....	11
.....	12
1.3.3. Outros Defeitos	13
1.4. Factores de Qualidade.....	14
1.5. Análise Sensorial	15
1.6. Análises Físico-químicas	19
1.6.1. Legislação	20
1.7. Tempo de vida útil.....	21
1.8. Procedimento da tecnologia de produção de vinagres Gallo.....	Erro! Marcador não definido.
1.8.1. Produção	Erro! Marcador não definido.
1.8.2. Engarrafamento.....	Erro! Marcador não definido.
2. A GALLO.....	25
3. OBJECTIVOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Marcador não definido.
4.1. Observação macroscópica e determinação percentual de defeitos em vinagres ..	Erro! Marcador não definido.
4.2. Observação macroscópica da influência de potenciais factores depreciativos da qualidade de vinagres.....	Erro! Marcador não definido.
4.2.1. Armazenamento pré-engarrafamento e influência da “filtração VG”	Erro! Marcador não definido.
4.2.2. Influência da ausência e da presença de oxigénio a 23 °C.....	Erro! Marcador não definido.

- 4.2.3. Influência da ausência e da presença de oxigénio a 31,5 °C.. **Erro! Marcador não definido.**
- 4.2.4. Influência da ausência e da presença de oxigénio a 4 °C..... **Erro! Marcador não definido.**
- 4.3. Observação microscópica de defeitos em vinagres **Erro! Marcador não definido.**
- 4.4. Avaliação sensorial **Erro! Marcador não definido.**
- 4.5. Determinações analíticas **Erro! Marcador não definido.**
- 4.5.1. Determinação do teor de dióxido de enxofre **Erro! Marcador não definido.**
- 4.5.2. Contagem de enterobactérias, de bactérias lácticas e de bactérias acéticas.. **Erro! Marcador não definido.**
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... **Erro! Marcador não definido.**
- 5.1. Procedimento da tecnologia de produção de vinagres Gallo..... **Erro! Marcador não definido.**
- 5.2. Observação macroscópica e determinação percentual de defeitos em vinagres .. **Erro! Marcador não definido.**
- 5.3. Observação macroscópica da influência de potenciais factores depreciativos da qualidade de vinagres..... **Erro! Marcador não definido.**
- 5.4. Observação microscópica de defeitos em vinagres **Erro! Marcador não definido.**
- 5.5. Avaliação sensorial **Erro! Marcador não definido.**
- 5.6. Determinações analíticas: determinação do teor de dióxido de enxofre e contagem de enterobactérias, de bactérias lácticas e de bactérias acéticas **Erro! Marcador não definido.**
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS **Erro! Marcador não definido.**
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS28
8. ANEXOS **Erro! Marcador não definido.**
- Anexo 1 – Diagrama de produção de vinagres de vinho Gallo (tinto, branco, espumante e com adição de aroma a framboesa) e de fermentados de frutos (sidra) .. **Erro! Marcador não definido.**
- Anexo 2 – Instrução de prova de análise sensorial de vinagres **Erro! Marcador não definido.**
- Anexo 3 – Folha de prova de análise sensorial de vinagres **Erro! Marcador não definido.**
- Anexo 4 – Observação macroscópica e determinação percentual de defeitos em vinagres (“Provas de Vida”) **Erro! Marcador não definido.**
- Anexo 5 – Observação macroscópica e determinação percentual de defeitos em vinagres (Fases de Engarrafamento de Lote) **Erro! Marcador não definido.**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Balança comercial de vinagre em Portugal de 2000 a 2012	2
Figura 2 – Etapas essenciais da produção de vinagre	4
Figura 3 – Equação química da acetificação	5
Figura 4 – Corte transversal de um acetificador do Método Lento	5
Figura 5 – Corte transversal de um acetificador do Método Rápido.....	6
Figura 6 – Corte transversal de um biorreactor do Método Frings	8
Figura 7 – Modelo hipotético que explica a formação de um depósito em forma de anel no gargalo de uma garrafa de vinho.	12
Figura 8 – <i>Liqua-bins</i> na zona inicial de armazenamento exterior	Erro! Marcador não definido.
Figura 9 – <i>Light box</i>	Erro! Marcador não definido.
Figura 10 – Amostras de vinagre de vinho branco na <i>light box</i>	Erro! Marcador não definido.
Figura 11 – Amostras de vinagre de vinho tinto no frigorífico ..	Erro! Marcador não definido.
Figura 12 – Amostras de vinagre de vinho branco defeituosas	Erro! Marcador não definido.
Figura 13 – Incidência de defeitos em vinagre engarrafado, em percentagem, nos diferentes meses em estudo do teste das “provas de vida”	Erro! Marcador não definido.
Figura 14 - Defeito biofilme do tipo transparente/esbranquiçado, fino e de crescimento rápido, em vinagre de vinho tinto.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 15 – Amostras de vinagre de vinho branco submetidas ao teste a 31,5 °C por 2 semanas.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 16 – Amostras de vinagre de vinho tinto submetidas ao teste a 31,5 °C por 2 semanas.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 17 – Preferências dos provadores relativamente às marcas em prova (à esquerda). Perfis sensoriais das duas marcas em prova (à direita), no que diz respeito ao vinagre de vinho branco.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 18 – Preferências dos provadores relativamente às marcas em prova (à esquerda). Perfis sensoriais das duas marcas em prova (à direita), no que diz respeito ao vinagre de vinho tinto.....	Erro! Marcador não definido.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplo de atributos descritores da complexidade organoléptica de vinagres...	18
Tabela 2 – Análises físico-químicas em vinagres	19
Tabela 3 – Legislação para vinagres em Portugal	20
Tabela 4 – Legislação internacional para vinagres	21
Tabela 5 – Legislação para vinagres no Brasil	21
Tabela 6 – Número de amostras com os defeitos partículas e biofilme nos diferentes graus de intensidade e presença, em 3 diferentes fases (inicial, intermédia e final) de engarrafamento de lote.	Erro! Marcador não definido.
Tabela 7 – Número de amostras com os defeitos partículas, biofilme e turvação nos diferentes graus de intensidade e presença, em 3 diferentes fases (inicial, intermédia e final) de engarrafamento de lote.	Erro! Marcador não definido.
Tabela 8 – Diferentes graus de intensidade e presença de defeitos, em 9 amostras de 3 diferentes testes (liqua-bin, sem filtração e com filtração) provenientes de 3 liqua-bins. .	Erro! Marcador não definido.
Tabela 9 – Diferentes graus de intensidade e presença de defeitos, em 8 amostras submetidas à temperatura de 23 °C em 3 diferentes <i>timings</i> , sobre presença ou ausência de oxigénio, em vinagre de vinho branco e tinto.....	Erro! Marcador não definido.
Tabela 10 – Diferentes graus de intensidade e presença de defeitos, em 8 amostras submetidas à temperatura de 31,5 °C em 3 diferentes <i>timings</i> , e sobre presença ou ausência de oxigénio, em vinagre de vinho branco e tinto.....	Erro! Marcador não definido.
Tabela 11 – Diferentes graus de intensidade e presença de defeitos, em 8 amostras submetidas à temperatura de 4 °C em 2 diferentes <i>timings</i> , e sobre presença ou ausência de oxigénio, em vinagre de vinho branco e tinto.....	Erro! Marcador não definido.
Tabela 12 – Análises efectuadas a diferentes parâmetros, em amostras em diferentes condições/estados, em laboratório externo.	Erro! Marcador não definido.
Tabela 13 – Valores de dióxido de enxofre medidos em duas amostras de vinagre em diferentes fases e estados de degradação, em 3 laboratórios externos à VG.	Erro! Marcador não definido.
Tabela 14 – Diferentes graus de intensidade e presença de defeitos, em 50 amostras “provas de vida” de vinagre de vinho branco.	Erro! Marcador não definido.
Tabela 15 – Diferentes graus de intensidade e presença de defeitos, em 9 amostras de vinagre de vinho tinto, em 3 diferentes fases de enchimento de lote.	Erro! Marcador não definido.

Tabela 16 - Diferentes graus de intensidade e presença de defeitos, em 9 amostras de condimento balsâmico branco, em 3 diferentes fases de enchimento de lote. **Erro! Marcador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS

BAA - Bactérias do ácido acético

GC-MS - *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, em português: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

GC-O - *Gas Chromatography – Olfactometry*, em português: cromatografia gasosa – olfactometria

HDPE - *High density polyethylene*, em português: polietileno de elevada densidade

HPLC - *High performance liquid chromatography*, em português: cromatografia líquida de elevada eficiência

HPLC-MS - *Liquid chromatography – mass spectrometry*, em português: cromatografia líquida-espectrometria de massa

HS-SPME - *Headspace Solid-Phase Micro Extraction*

INE - Instituto Nacional de Estatística

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

m/v - Razão massa volume

PET - Tereftalato de polietileno

ppm - Partes por milhão

SBSE - *Stir Bar Sportive Extraction*

VG - Fábrica Victor Guedes

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tipos de Vinagre, História e Mercados

De acordo com a definição internacional de vinagre e com a versão portuguesa da Norma europeia 13188 de 2008, “vinagre é o líquido apto para consumo humano, produzido exclusivamente a partir de matérias-primas amiláceas ou provenientes de frutos, que são sujeitas a uma primeira fermentação alcoólica e a uma posterior acética. Estas matérias-primas devem ser produtos de origem agrícola, em conveniente estado de maturação e que se apresentem isentos de substâncias ou de matérias estranhas à sua normal composição, bem como de microrganismos patogénicos ou de substâncias derivadas destes, em níveis que possam ser prejudiciais à saúde do consumidor”.

Em consonância com o Decreto-Lei nº 174 de 8 de Maio de 2007, com o Codex Alimentarius de 30 de Julho de 2000, e com a versão portuguesa da Norma europeia 13188 de 2008, referentes aos vinagres, distinguem-se os seguintes tipos:

- Vinagre de Vinho
 - Tinto, Branco ou Espumante: obtido pela fermentação acética de vinho tinto, branco ou espumante, respectivamente;
 - Vinagre Balsâmico Tradicional de Modena (originário da localidade italiana Modena)
 - Vinagre Balsâmico de Modena (originário das localidades italianas Modena e/ou Reggio Emilia)
 - Obtidos a partir de mosto de vinho branco cozido e envelhecido em barris de madeira. O segundo é no fim misturado com vinagre de vinho tinto;
 - Condimento Balsâmico Branco: obtido pela mistura de vinagre de vinho branco com mosto de uvas já fermentado;
- Vinagre de Fruta, de Bagas e de Sidra: obtidos por fermentação acética de vinho de frutas, de bagas ou de sidra, respectivamente;
- Vinagre de Álcool: obtido pela fermentação acética de álcool destilado de origem agrícola.

Existem ainda vinagres de cereais, de malte, de soro de leite, de mel, aromatizado ou com especiarias, de arroz, entre outros, estando de uma forma geral estes produtos associados às matérias-primas mais abundantes dos países dos quais são originários.

Ao vinagre poderão ser adicionadas plantas aromáticas ou partes destas e/ou os seus extractos, especiarias e fruta, soro de leite, sumo de fruta ou concentrado de sumo de fruta, açúcar, mel e/ou sal de qualidade alimentar. São ingredientes proibidos aromas artificiais, óleo

de grainha de uva, resíduos de destilação, resíduos ou subprodutos de fermentação, substâncias extraídas de bagaço e ácidos.

A utilização do vinagre data do oitavo milénio A.C. (antes de Cristo), onde era utilizado como conservante pelas civilizações egípcias. Hoje em dia é, em termos alimentares, utilizado na preparação industrial e/ou caseira de molhos (*ketchup*, mostarda, maionese, vinagretes, entre outros), marinadas e conservas (como por exemplo *pickles* e escabeche) (Laranjeira, 2014). Noutras áreas registam-se já aplicações ao nível da medicina, nomeadamente no controlo da diabetes, do colesterol, em estudos sobre vários tipos de cancro, entre outras (Petsiou *et al.*, 2014; Sugiyama *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2014; Zandim *et al.*, 2004).

Em termos mundiais o vinagre de álcool é sem dúvida o vinagre mais produzido (Mas *et al.*, 2014). Este apresenta uma enorme versatilidade quando comparado com os demais vinagres, conserva-se muito melhor e mantém-se límpido mais facilmente, é quase incolor, contudo é desprovido de um particular *flavour*¹ (Laranjeira, 2014). Em termos nacionais destaca-se o vinagre de vinho, nomeadamente o de vinho branco, que representa aproximadamente 80% do total de vendas de vinagre no Mercado português, não sendo de descuidar que as últimas tendências gastronómicas estejam a encaminhar os consumidores para as variedades mais inovadoras, disponíveis nos últimos anos, como por exemplo o vinagre balsâmico de Modena, um vinagre IGP (indicação geográfica protegida).

Na relação de Portugal com o exterior registou-se recentemente, desde 2009, um saldo comercial positivo, tendo as importações descido aproximadamente 6%, concomitante com um aumento de cerca de 8% nas exportações (Figura 1).

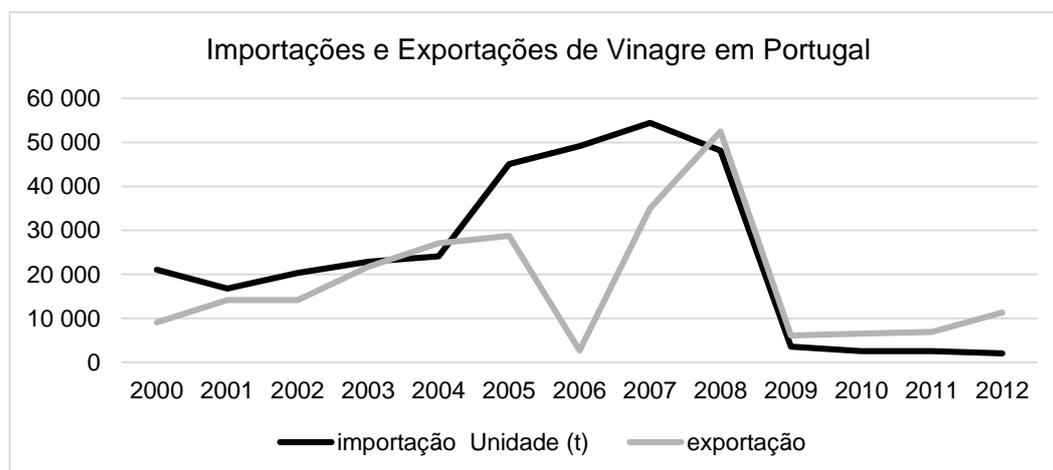


Figura 1 – Balança comercial de vinagre em Portugal de 2000 a 2012

(Fonte: adaptado de INE, 2013)

¹ O *flavour* ou flavor é uma sensação fisiológica que compreende a interação entre o paladar (gosto e tacto de boca) e o olfato.

Numa análise de mercado mundial, as marcas brancas (do distribuidor) encontram-se claramente em vantagem nas categorias de *commodities*², onde se insere o vinagre, ao contrário do que acontece com produtos para os quais há um forte apoio de marketing e aqueles em que há um forte investimento ao nível da inovação. Em Portugal, a importância das marcas dos fabricantes representa 25% do total (Nielsen, 2010).

1.2. Tecnologia de Produção de Vinagre

O processamento deste produto inicia-se por uma fermentação alcoólica, em que os açúcares simples (mono e dissacáridos) das matérias-primas são convertidos em etanol por leveduras, como por exemplo a *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo-se desta forma o designado fermentado alcoólico, que é posteriormente sujeito ao processo de acetificação.

² Designa-se por *commodity* um bem ou serviço para o qual existe procura mas sem atender à diferenciação de qualidade do produto no conjunto dos mercados e entre os vários fornecedores ou marcas.

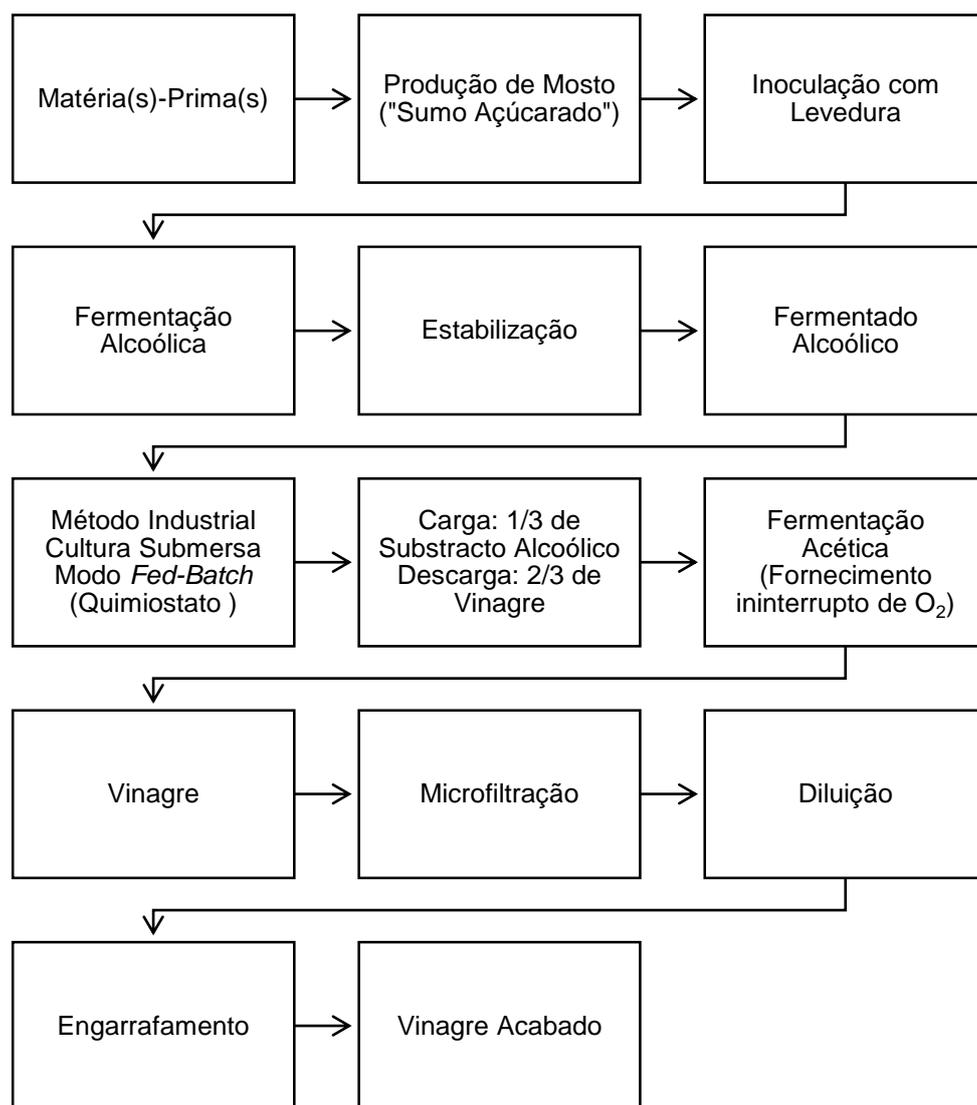


Figura 2 – Etapas essenciais da produção de vinagre
(Fonte: Adaptado de Budak *et al.*, 2014; Gullo *et al.*, 2014)

1.2.1. Acetificação

O primeiro processo de acetificação, designado por *let alone*, surgiu no Egipto (8000 A.C.) e pressupunha o “abandono” de vinho em contacto com o ar atmosférico (Cuinier & Guerineau, 1978). Depois de no século XIV ter surgido em Orleães (França) um processo tradicional bastante mais sofisticado (Método *Orleans*, Lento ou Francês), foi no século XVIII, na Holanda, que Boerhaave melhorou a produção vinagreira. No século XIX, Scutzenbach adaptou o método holandês industrializando a produção de vinagre, surgindo assim o Método Rápido ou Alemão (Laranjeira, 2014). O método mais recente é o método formulado pela empresa alemã Heinrich Frings já no século XXI, muito mais sofisticado relativamente aos

restantes, representando hoje em dia, grande parte da produção mundial de vinagre (Ebner *et al.*, 1996; Mas *et al.*, 2014).

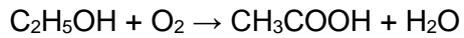


Figura 3 – Equação química da acetificação

(Fonte: Ebner *et al.*, 1996)

A acetificação é uma fermentação aeróbia em que o etanol (do fermentado alcoólico) é oxidado a acetaldeído e este em ácido acético por BAA (bactérias do ácido acético), dando origem a vinagre (Matsushita *et al.*, 2004) (Figuras 2 e 3). É uma reacção exotérmica.

Pelo método de Orleães, a acetificação é iniciada pela “mãe do vinagre”, um biofilme formado por BAA na superfície da mistura (Sengun & Karabiyikli, 2011). Os depósitos de acetificação (barris de madeira) são cheios até 2/3 da sua capacidade para que a mistura a acetificar possa ser oxigenada, por circulação de ar nos orifícios laterais. O tubo em forma de “J” fixo no centro do barril, tal como está representado na Figura 4, permite a adição do substrato alcoólico à mistura, sem que a “mãe do vinagre” seja danificada. A actividade das BAA na produção de vinagre é facilitada pela adição de apenas 1/3 do volume total da mistura de substrato alcoólico. Todo este processo tem a duração aproximada de 2 meses (Budak *et al.*, 2014). As etapas posteriores compreendem o envelhecimento do vinagre, a filtração (para recolher e reservar a “mãe do vinagre”, bem como remover as possíveis partículas suspensas). Segue-se uma diluição com água até à concentração desejada e posterior engarrafamento, obtendo-se assim o vinagre acabado.

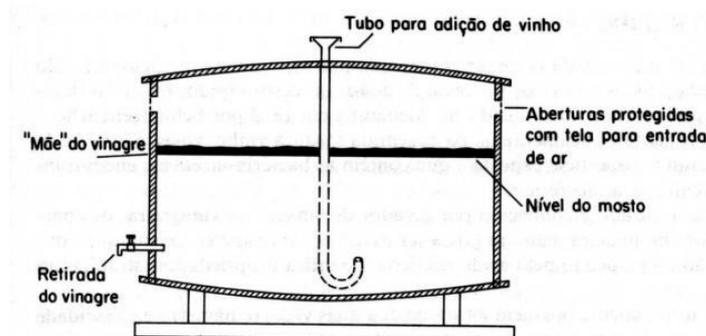


Figura 4 – Corte transversal de um acetificador do Método Lento

(Fonte: Aquarone *et al.*, 1983)

Os vinagres obtidos por este método apresentam uma elevada complexidade organoléptica, devendo-se tal facto essencialmente ao processo de envelhecimento em barris de madeira e a alguns metabolitos secundários produzidos pelas BAA.

O acetificador do Método Rápido é constituído por 3 compartimentos. A adição de substrato concomitante com a remoção de vinagre é feita pelo compartimento inferior. No intermédio decorre a percolação - circulação e filtração da mistura por acção de materiais porosos com elevada superfície de contacto, como carvão vegetal ou serradura, onde as BAA se agregam. É neste que o inóculo (vinagre com população activa de BAA) é adicionado. O superior, é o compartimento onde circula repetidas vezes o substrato alcoólico, com simultânea injeção de ar no sentido contrário (Figura 5). Podem operar em série. Devido à elevada temperatura atingida, o acetificador dispõe de um sistema de arrefecimento.

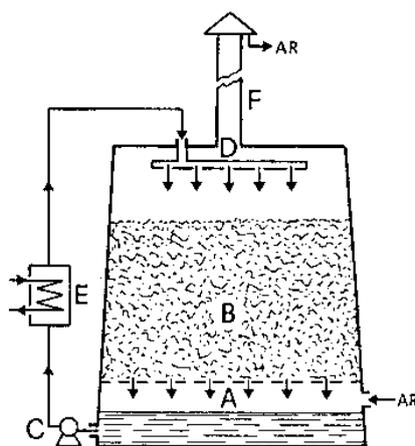


Figura 5 – Corte transversal de um acetificador do Método Rápido

A) crivo; B) material poroso; C) alimentação automática; D) agitador; E) arrefecimento; F) libertação de gases.

(Fonte: Aquarone *et al.*, 1983)

A principal desvantagem deste método está relacionada com a fácil contaminação do material poroso com microrganismos desfavoráveis ao processo (Laranjeira, 2014).

1.2.2. Método *Frings*

O mais recente método de produção de vinagre, designado por Método *Frings*, é um sistema com culturas submersas e que geralmente opera em modo semi-contínuo ou *fed-batch*, ou seja, a alimentação do biorreactor (acetificador) é contínua até que se atinja o limite do mesmo, podendo depois as reacções bioquímicas continuar sem que seja descarregado vinagre. É desta forma que a actividade das BAA é favorecida. Num biorreactor em modo contínuo ou *batch* a elevada concentração de etanol inibe a actividade destas, obtendo-se baixos rendimentos em ácido acético (9 a 10% (v/v)) (Mamlouk & Gullo, 2013). Geralmente combinam-se 2 biorreactores em série. O primeiro é o que contém o inóculo, proveniente do ciclo anterior, e é neste que o líquido alcoólico a acetificar (12-15% (v/v) de etanol) é lentamente adicionado (Gullo *et al.*, 2014). Quando a mistura atinge um teor de etanol de

cerca de 2-3% (v/v), esta é bombeada para o segundo biorreactor onde permanecerá até que seja atingido o teor de ácido acético pretendido (Ebner *et al.*, 1996), 40 a 45% do vinagre é então rapidamente descarregado com concomitante alimentação do primeiro biorreactor com a mesma quantidade de substracto alcoólico (Gullo *et al.*, 2014; Laranjeira, 2014). E assim completa-se 1 ciclo de fermentação.

Durante todo o processo há um controlo automatizado de ácido acético, etanol e de oxigénio (Mamlouk & Gullo, 2013). Adams referido em Mamlouk & Gullo (2013) refere a importância do sistema ininterrupto de arejamento característico deste método. A privação de O₂ pode ser prejudicial em qualquer transferência de culturas, desde a sua forma de pré-cultura, até à passagem de um biorreactor, ou depósito, para outro. Contudo, o elevado teor de O₂ dissolvido também é prejudicial uma vez que pode inibir o crescimento das BAA, contribuindo para o *stress* oxidativo e danos celulares (Cabiscol *et al.*, 2000).

O ar filtrado por carvão activado é injectado na mistura por uma turbina, sob a forma de microbolhas de ar, em jactos radiais que abrem no sentido contrário ao seu movimento de rotação, de forma homogénea. O processo oxidativo ocorre na interface ar-líquido das microbolhas (suporte das BAA) (Ebner *et al.*, 1996). A agitação é constantemente mantida para evitar a formação de regiões de baixa tensão de oxigénio, desfavoráveis à actividade metabólica das BAA (Schlepütz *et al.*, 2013). A taxa de transferência de oxigénio depende da agitação pois a mesma facilita o rompimento das bolhas grandes em bolhas sucessivamente mais pequenas, na tensão de superfície da solução. A agitação origina a formação de espuma, que deve ser eliminada para não comprometer todo o processo de acetificação, depois de centrifugada é então descartada. Da centrifugação resultam também gases que são reencaminhados para um sistema de purificação do ar, *scrubber*, podendo depois ser libertados para a atmosfera (Figura 6).

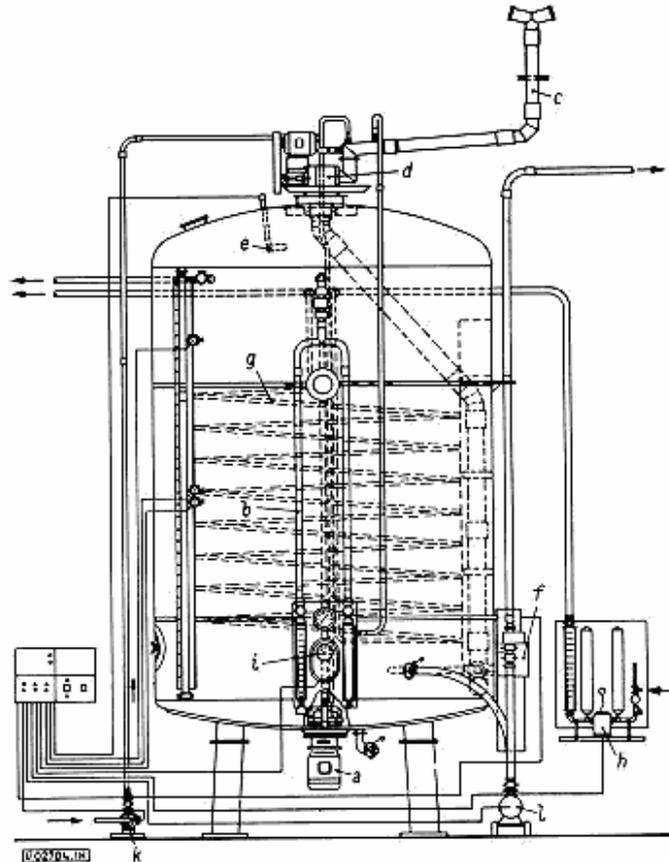


Figura 6 – Corte transversal de um biorreactor do Método *Frings*

- a) serpentina de ar; b) injetor de ar; c) libertação de gases; d) e) libertação de espuma; f) medidor do teor de etanol; g) serpentina de arrefecimento; h) permutador de placas; i) termómetro; j) alimentação; k) descarga.

(Fonte: Mecca *et al.*, 1979)

A temperatura ideal de fermentação é de 30 °C, sensivelmente (Budak *et al.*, 2014), sendo o arrefecimento da mistura efectuado por permutadores de placas que operam em simultâneo. Cada ciclo de fermentação dura aproximadamente 18 a 30 horas, dependendo da concentração de etanol durante o processo, da eficácia do sistema de oxigenação e da duração da fase de latência bacteriana (Macias *et al.*, 1997). Se se tratar do primeiro ciclo de acetificação, por exemplo após higienização de todo o circuito de produção, a duração da acetificação deverá ser mais longa, aproximadamente o dobro do tempo.

As vantagens deste método são, essencialmente, a elevada eficiência em ácido acético (aproximadamente 18%), o elevado rendimento (cerca de 97%), o elevado grau de automatização e o facto de ser prático em termos de higienização e resistente à corrosão. As desvantagens centram-se sobretudo nos custos inerentes e na desvalorização da componente organoléptica pela perda de compostos voláteis naturalmente presentes no

substracto alcoólico, por evaporação. No entanto, para esta última desvantagem, um posterior envelhecimento do vinagre, em barris de madeira ou em depósitos de inox com aparas de madeira, pode ser uma solução (Ebner *et al.*, 1996; Laranjeira, 2014; Mamlouk & Gullo, 2013).

As etapas pós-fermentação englobam, de uma maneira geral, uma filtração, possível clarificação, posterior diluição e o engarrafamento. O tipo de filtração geralmente utilizado é uma microfiltração com membranas tangenciais com um diâmetro de poro muito reduzido (μm), permitindo assim a retenção das partículas mais pequenas (Heinrich Frings, 2014). Depois é diluído com água até às concentrações pretendidas. Os “vinagres condimento” ou “vinagres de mesa” são engarrafados com uma acidez de 4 a 6% (em ácido acético) e os “vinagres fortes” com uma acidez de 7 a 8% (Laranjeira, 2014).

Para o engarrafamento, que é mecânico, podem ser utilizadas garrafas de vidro ou de PET (tereftalato de polietileno). A grande desvantagem do material em PET é a sua permeabilidade aos gases, que embora pequena, existe, ao contrário do vidro que não apresenta permeabilidade aos gases.

Depois de acetificação, não existe perigo de deterioração, uma vez que o ácido acético tem uma forte actividade antibacteriana e um pH baixo. O valor de pH do vinagre é muito importante uma vez que este afecta os mecanismos de dissociação dos ácidos. É difícil determinar o seu valor de forma precisa, contudo, valores na gama dos 2,3 a 2,8 têm sido indicados em estudos anteriores. O cozimento do mosto e o seu envelhecimento podem diminuir ligeiramente o pH (Solieri & Giudici, 2009).

1.3. Microbiologia das Bactérias do Ácido Acético

As BAA pertencem à classe de bactérias *Alphaproteobacteria*, à família *Acetobacteraceae*, à qual pertencem 15 géneros (Bartowsky & Henschke, 2008) (como os géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*), e aproximadamente 70 espécies (Mas *et al.*, 2014). Têm um metabolismo respiratório estritamente aeróbio, sendo o oxigénio maioritariamente utilizado como aceitador final de electrões (Torsvik *et al.*, 1990). São gram negativas ou gram variáveis, não apresentam forma esporulada, têm forma elipsoidal, cilíndrica ou de bastonete e o seu tamanho varia de 0,4 a 1 μm de largura e 0,8 a 4,5 μm de comprimento (Sengun & Karabiyikli, 2011). Podem ser observadas ao microscópio isoladas, em pares ou em cadeia (Gullo *et al.*, 2014).

Fazem parte da microbiota natural de substractos que contêm açúcares e/ou álcool, como uvas, vinho e vinagre, sendo por estes incompletamente oxidados, produzindo ácido acético. Estas reacções são realizadas por duas enzimas catalisadoras, produzidas pelas BAA: a álcool desidrogenase (que converte o etanol em acetaldeído) e a acetaldeído desidrogenase

(que converte o acetaldeído em ácido acético). Podem também realizar metabolitos secundários como a oxidação da glucose em ácido glucónico, da galactose em ácido galactónico, da arabinose em ácido arabinóico e por aí em diante (Sengun & Karabiyikli, 2011).

O metabolismo de algumas BAA pode incluir o ciclo do ácido tricarbóxico, se a concentração de etanol for baixa (entre 0,5 e 1%), permitindo-as converter o ácido acético em CO₂ e água (superoxidação) (Mas *et al.*, 2014).

O género *Acetobacter* apresenta preferência por etanol como substrato, enquanto os géneros *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* têm preferência por glucose. No que diz respeito ao teor em ácido acético, as *Acetobacter* dominam em meios com concentração de ácido acético inferior a 5%, ao contrário dos outros dois géneros, embora não tolerando concentrações superiores a 20%, sensivelmente (Gullo *et al.*, 2009; Mas *et al.*, 2014). Relativamente ao pH, as BAA são geralmente inibidas em misturas com pH entre 2 e 4.

A actividade fermentativa da maioria das BAA é favorecida a 30 °C. Mamlouk & Gullo (2013) verificaram que as *Acetobacter aceti*, muito comum em vinagres, são inibidas a temperaturas inferiores a 8 °C e geralmente destruídas a temperaturas superiores a 35 °C. No entanto, por terem aptidão para desenvolver mecanismos de defesa contra o *stress* térmico, conseguem adaptar-se a temperaturas de 38 a 40 °C.

A adição de SO₂ (dióxido de enxofre) ao vinagre, usualmente realizada na generalidade dos vinagres, no fim da fermentação acética, permite reduzir a população bacteriana, nomeadamente de BAA, para valores inferiores a 10² UFC / mL (Boulton *et al.*, 1996), devido aos efeitos antioxidantes (inibindo as reacções de oxidação) e antissépticos (destruindo BAA) deste, embora dê também origem à alteração de vários equilíbrios químicos (Boulton *et al.*, 1996; Casale *et al.*, 2006).

Existem estudos que comprovam que *Acetobacter aceti* tem aptidão para proliferar na presença de 25 mg / L de SO₂ livre tendo um total de pelo menos 100 mg / L de SO₂ total demonstrado ser necessário para controlar o crescimento de espécies de BAA.

As BAA podem permanecer inactivas por extensos períodos de tempo em ambientes anaeróbios ou semi-aeróbios, podendo operar assim que reúnam condições favoráveis (Bartowsky & Henschke, 2008). Por exemplo, no Método *Orleans*, os poros da madeira dos barris apresentam-se como ambientes seguros para a sobrevivência das BAA, que resistem mesmo às lavagens destes.

1.3.1. A Matéria-prima Vinho

A matéria-prima que na indústria vinagreira oferece mais dificuldades do ponto de vista microbiológico é o vinho. Danos físicos nas uvas ou uvas infectadas com fungos são bons

habitats para as BAA, assim como mostos de uva, ou durante uma paragem de fermentação se houver exposição ao ar.

Estudos recentes têm mostrado que a oxigenação momentânea, como a agitação ou trasfega de vinho é suficiente para incentivar o crescimento significativo da população residente de BAA (de 10^2 a 10^5 células / mL). Deste modo, práticas de vinificação cujo contacto com o O_2 esteja implícito, devem ser acauteladas.

O facto de o vinho, especialmente o tinto, ser geralmente maturado durante vários meses ou anos antes do engarrafamento faz com que seja considerado microbiologicamente estável. Não só por esta razão, mas também, surgiu a tendência para reduzir a adição de SO_2 , o que tem demonstrado dar origem à proliferação de BAA em tempo inoportuno, culminando num vinho contaminado.

1.3.2. *Gluconacetobacter xylinus* – biofilme de celulose

As bactérias *Gluconacetobacter xylinus* são capazes de sintetizar celulose pela utilização de glucose como fonte de carbono formando uma película na superfície do vinagre, como a “mãe do vinagre” (inóculo do Método *Orleans*) já referida nesta tese.

A celulose é um polissacárido estrutural, formado por cadeias lineares não ramificadas de monossacáridos, produzido por várias bactérias e que pode ser encontrado na superfície de muitos ambientes aquosos (Spiers *et al.*, 2003; Sutherland, 2001; Teh *et al.*, 2014).

A celulose bacteriana tem inúmeras aplicações na indústria têxtil, na indústria alimentar (como espessante), é também muito utilizada em medicina (como substituto temporário da pele humana, no tratamento de queimaduras, lesões e ferimentos), e na medicina dentária. É por esta razão que é considerada uma *commodity* bioquímica (Recouvreux, 2004).

Madigan & Martinko (2006) referiram que esta celulose apenas difere da celulose que constitui as paredes celulares das plantas nos polímeros que a constituem (Sengun & Karabiyikli, 2011).

Este biofilme de celulose pode apresentar-se nas seguintes formas:

- Fino, branco e de crescimento rápido;
- Grosso e de formação lenta;
- Em camada espessa, viscosa e difícil de romper (Laranjeira, 2014).

As BAA são também capazes de produzir elevadas concentrações de ácido acético, uma vez que a estrutura em rede de nanofibras da membrana de celulose retém células na interface ar-líquido, facilitando a absorção de oxigénio.

Em condições de agitação, *Gluconacetobacter xylinus* apresentou, em anteriores estudos, um crescimento retardado e um menor consumo de substrato (Fu *et al.*, 2013).

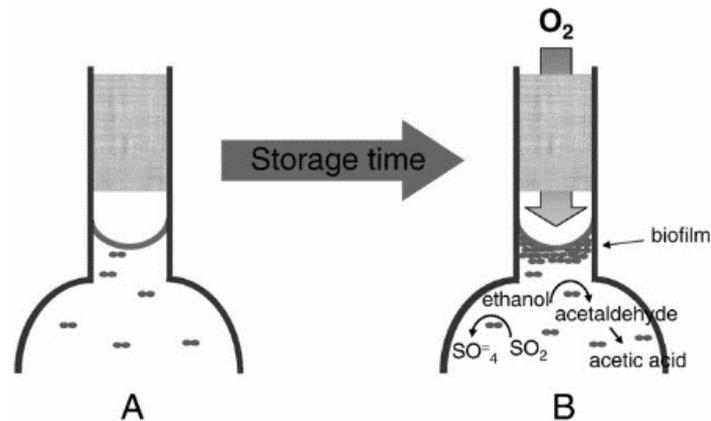


Figura 7 – Modelo hipotético que explica a formação de um depósito em forma de anel no gargalo de uma garrafa de vinho.

Garrafa A – A entrada de insuficiente oxigênio na garrafa apenas permite a presença de uma população vestigial de BAA.

Garrafa B - A entrada de suficiente oxigênio na garrafa permite o crescimento de uma população de BAA, bem como o início da formação de um depósito na interface vinho - “espaço de cabeça”.

(Fonte: Bartowsky & Henschke, 2008)

Apesar de ser imprescindível no Método *Orleans*, noutro contexto este biofilme apresenta-se como um defeito, podendo originar vinagre turvo e/ou com depósito, em garrafa.

A deterioração de vinho engarrafado foi em recentes estudos associada ao desenvolvimento de filmes de celulose sintetizados por BAA, nos gargalos das garrafas aquando da presença de oxigênio por efeitos de ineficiente encapsulamento e armazenamento na posição vertical das garrafas (Yakushi & Matsushita, 2010). O desenvolvimento deste biofilme tende a ocorrer no pós-engarrafamento durante o seu armazenamento (Teh *et al.*, 2014).

Esta deterioração observa-se como um depósito distinto no gargalo da garrafa e na interface do vinho e do “espaço de cabeça”, sendo que a espessura do referido “anel” varia consoante o grau de deterioração atingido (Figura 7). Estes vinhos tornam-se oxidados, sem brilho e com uma diminuição do seu aroma frutado e *flavour*.

A posição de armazenamento da garrafa tem pouca influência na composição química do vinho e nas suas propriedades organolépticas. As garrafas que são mantidas na vertical deixam um “espaço de cabeça” entre o gargalo da garrafa considerável pelo que o O_2 migra com uma certa facilidade do exterior para o interior da garrafa. Há estudos que comprovam que num ano podem entrar vários mililitros de oxigênio numa garrafa. Modernos equipamentos e materiais de engarrafamento, poderão minorar este acontecimento.

1.3.3. Outros Defeitos

- Turvação e/ou depósito:
 - Oxidação;
 - Reacção de *Maillard*;
 - Precipitação de matéria corante;
 - Casse química;
 - Férrica;
 - Cúprica;
 - Proteica;
 - Oxidásica (Ministério da Agricultura, 2014).

O armazenamento de vinagres em garrafa origina alterações organolépticas no produto, devido à evolução, à oxidação e ao envelhecimento de alguns dos compostos físico-químicos presentes em vinagres. A presença de oxigénio normalmente desencadeia uma série de reacções enzimáticas e químicas de diferentes origens, resultando nos seguintes defeitos: (a) o escurecimento do vinagre; (b) a presença de precipitados castanhos; (c) a perda de densidade; (e) e a perda de aromas. Estas alterações diferem de vinagre para vinagre e dependem do tipo de vinagre, matéria-prima, processo de elaboração e condições de armazenamento.

A precipitação de matéria corante é um processo em que os compostos fenólicos condensam dando origem a matéria corante coloidal e a tartaratos.

A turvação coloidal é constituída por sais tartáricos, antocianas, taninos e polissacáridos. A passagem ao estado coloidal depende da temperatura, da acção enzimática e da acidez (Ministério da Agricultura, 2014).

A casse férrica pode ser originada devido às castas de que os vinhos provieram, ao solo e à vindima, essencialmente. O ferro favorece a agregação dos taninos em partículas coloidais que resultam em partículas de maiores dimensões como polissacáridos, compostos insolúveis em solução. Os factores que influenciam o aparecimento deste defeito prendem-se com o oxigénio, a temperatura, a acidez, o pH de 3,3, que é o óptimo de insolubilização.

A casse cúprica é potenciada em vinhos sulfitados, pela luz, pela temperatura elevada e tem uma cor castanha avermelhada. Para evitar este defeito deve-se fazer um tratamento com bentonite à temperatura de 75 a 80 °C durante uma hora, com posterior colagem seguida de filtração.

A casse oxidásica ocorre normalmente em vinhos novos com pouco SO₂, e resulta de vinho cujas uvas podres foram atacadas por *Botrytis cinerea* que segrega a enzima oxirredutase-lactase (temperatura óptima: 40 a 50 °C; pH óptimo: o normal do vinho), que por sua vez é

responsável pela degradação dos compostos fenólicos que se vão progressivamente insolubilizando. Habitualmente é feito um teste de estabilidade em que se coloca o vinho ao ar no mínimo 12 horas, caso não se mantenha límpido existe o risco de ocorrência de casse oxidásica (Ministério da Agricultura, 2014).

Quando o oxigénio entra em contacto com o vinagre, um decréscimo até ao desaparecimento total, no conteúdo do seu conservante é verificado, se não se tratar de um vinagre submetido a outro processo de conservação que não a adição de um aditivo, como o SO₂ ou o ácido cítrico. O ácido cítrico estabiliza o vinagre, este reage com determinados metais (Ca, Mg,...), formando complexos solúveis, contudo, o dióxido de enxofre é ainda o mais utilizado como conservante e anti-séptico em vinho e vinagre. O desaparecimento de SO₂ no vinagre pela presença de oxigénio solícita as peroxidases activas para actuar sobre os compostos tânicos, dando origem à precipitação de substâncias insolúveis em que modificam a cor, o aroma e o sabor dos vinagres.

Vinagres com um elevado teor de glúcidos, como o vinagre balsâmico, podem ser alvo de reacções de *Maillard*, que induz a condensação de glúcidos simples (glucose, frutose) e de aminoácidos livres (prolina, lisina) presentes nos vinagres, que origina uma série de reacções que culminam na polimerização e aparecimento de pigmentos escuros ou melanoidinas. É diferente do processo de caramelização, neste ocorre a desidratação, condensação e polimerização dos glúcidos.

Durante as etapas intermediárias, é produzido hidroximetilfurfural (HMF), que é muito útil para a medição do grau de escurecimento ocorrido. Pectinas, gomas e mucilagens também são afetadas pelas enzimas responsáveis pela hidrólise pectinolítica nestes tipos de compostos, e isto provoca a perda de corpo do vinagre. As reacções de hidrólise conduzem à libertação de pentoses e de hexoses livres que podem participar na reacção de *Maillard* descrita acima. Tanto a precipitação das substâncias polifenólicas como a hidrólise das pectinas, gomas e mucilagens originam perda de cor, aroma e corpo do vinagre (Casale *et al.*, 2006). Este fenómeno é muito frequente no vinagre de sidra (Laranjeira, 2014), e em vinagres de frutos ou com adições de extractos destes, como por exemplo, vinagre de vinho com aroma a framboesa.

1.4. Factores de Qualidade

Os factores que alteram a qualidade dos vinagres podem estar relacionados com:

- A qualidade, quantidade (nomeadamente em termos de nutrientes) e natureza das matérias-primas;
- As características da microbiota;
- As condições de arejamento na acetificação;

- A temperatura da fermentação acética;
- As concentrações do inóculo, de ácido acético e de etanol na acetificação;
- O método de acetificação;
- As condições de clarificação, pasteurização ou sulfitação, envelhecimento (se existir) e engarrafamento;
- A constituição dos materiais dos equipamentos, tubagens e depósitos (Laranjeira, 2014).

Os defeitos em vinagres são atributos de ausência de qualidade resultantes destes factores.

1.5. Análise Sensorial

A análise sensorial é a ciência que através dos sentidos humanos (visão, olfacto, tacto, paladar e audição) caracteriza os atributos de um produto. É extremamente útil em estudos técnico-científicos; para avaliar as características de um produto com o intuito de melhorar a sua qualidade; antes de o colocar no Mercado; para desenvolver novos produtos ou modificar produtos já existentes; para avaliar o tempo de vida útil de um produto; para comparar um produto com os seus concorrentes e/ou para descobrir as preferências dos consumidores. Esta é influenciada essencialmente por factores fisiológicos, psicológicos e físicos.

Muito utilizada na indústria alimentar onde aí respeita determinados critérios, pressupõe uma sala de provas que deve constar num local amplo, bem iluminado, sem odores, silencioso, à temperatura de 20 °C e com paredes de cores neutras ou claras. Pressupõe ainda a utilização de uma ficha de prova descritiva, hedónica ou discriminativa, à qual deve ser atribuída uma escala de pontos, bem como de técnicas de apresentação das amostras.

Distinguem-se dois tipos de teste, o teste de diferenciação, que visa perceber se os produtos em teste são percebidos como diferença ou não, como o teste triângulo, ou o de comparação pareada, ou o teste de preferência. O teste de descrição, mais semelhante a uma análise química, visa identificar e medir a composição dos produtos, ou determinar a presença ou intensidade de uma característica particular. Este último requer uma análise estatística. Destaca-se o teste escala de razão e o teste de escala hedónica não estruturada. Neste último, as intensidades de cada atributo são medidas numa escala de 10 cm, sendo as extremidades ancoradas, por exemplo, com “mais fraco/pobre” e “mais forte/rico” (Tsfaye *et al.*, 2009).

O vinagre, por ser um condimento, detém a sua qualidade fortemente determinada por propriedades sensoriais (Solieri & Giudici, 2009). Contudo, não há nitidamente um consenso sobre como o vinagre deve ser provado (Tsfaye *et al.*, 2010).

Existe alguma dificuldade na análise sensorial de vinagres uma vez que o seu componente maioritário, o ácido acético, é muito pungente tornando a avaliação olfactiva e gustativa difícil por mascarar a percepção de outros compostos presentes no mesmo (Morales *et al.*, 2009; Tesfaye *et al.*, 2009).

A melhor hora para provar vinagres é ao fim da manhã, uma vez que é quando o provador tem o apetite aberto que se atinge o máximo de sensibilidade. As sensações implicadas na prova envolvem particularmente o olfacto, o paladar e a visão. Pelo referido no parágrafo acima, deve existir um número limitado de amostras para que os sentidos do provador não sejam afectados negativamente. No intervalo entre degustações, que deve ser de um minuto, no mínimo, o provador deve ter à disposição bolachas neutras, pão ou um pedaço de maçã e água.

A análise estatística dos dados é normalmente executada através de uma ANOVA (análise de variância) ou do método dos mínimos quadrados, que permitem um estudo mais aprofundado da variabilidade confiabilidade (Morales *et al.*, 2009). Análises descritivas podem, através de um gráfico de aranha, traçar um perfil sensorial.

Existem vários tipos de provadores como os provadores treinados, os ocasionais e os consumidores (Jackson, 2002). Um provador treinado deve apresentar capacidade de reconhecimento dos cinco sabores básicos: ácido, amargo, salgado, doce e *umami*³. No caso do vinagre baseia-se no reconhecimento de compostos aromáticos normalmente presentes neste.

Até á presente data, o vinagre tem sido degustado segundo os seguintes modelos:

- Por diluição dos seus compostos aromáticos, ácido acético, acetato de etilo, baunilha, β -metil- γ -octalactona e eugenol, em diferentes concentrações. Por levar à perda de determinados compostos aromáticos, como o odor a madeira, não é a forma mais correcta (Tsfaye *et al.*, 2009);
- Por degustação de grãos de arroz cozidos em água, embebidos em vinagre (Laranjeira, 2014);
- Por degustação de vinagre puro.

Para a prova são geralmente utilizados copos de vinho especificados em norma (ISO 3591:1977), opacos e de cor escura para não influenciar a resposta do painel de provadores (Morales *et al.*, 2009), com tampa, para que não haja perda de compostos voláteis e com uma inclinação de 45° em relação ao nariz.

³ *Umami* é uma palavra de origem japonesa que significa "gosto saboroso e agradável".

A prova engloba 3 exames, executados pela seguinte ordem e envolvendo as etapas que se seguem:

- Exame visual (cor e aspecto):
 1. Observar;
 2. Inclinarm o copo a 45° em relação aos olhos;
 3. Analisar os parâmetros: limpidez, corpos estranhos, intensidade e tonalidade.
- Exame olfactive (aroma):
 4. Retirar a tampa que cobre o copo;
 5. Sem agitar, analisar os parâmetros aromas delicados e voláteis;
 6. Agitar o vinagre no copo por 10 segundos e inclinar o copo para umedecer a superfície interior do copo com a amostra;
 7. Cheirar a amostra na borda do copo evitando o centro, onde a sensação pungente é mais intensa;
 8. Inclinarm o copo a 45° em relação ao nariz;
 9. Inspirar lentamente, de forma curta e não intensa, durante não mais de 15 segundos;
 10. Descartar a amostra e cheirar o copo vazio (Morales *et al.*, 2009).
- Exame gustativo (gosto, adstringência, temperatura, consistência (volume) e aroma de boca, pela via retro nasal):
 11. Ingerir um gole;
 12. Saborear rodando suavemente dentro da boca de modo a que se atinja todas as papilas gustativas;
 13. Entreabrir os lábios e aspirar um pouco de ar;
 14. Cuspir;
 15. Prestar atenção ao travo que resta (fim de boca) (Jackson, 2002).

O aroma é uma fracção complexa que contém muitos compostos com uma vasta gama de volatilidades e concentrações que variam das mg/L para as ng/L. Actualmente existem mais de 100 diferentes compostos identificados no aroma de vinagres de vinho, como compostos carbonilo, ésteres, acetais, lactonas, ácidos, álcoois e fenóis, todos envolvidos em diferentes extensões do *flavour* final (Callejón *et al.*, 2009). A maior parte do aroma é perdido na oxidação, pelo Método *Frings*, porque é muito intensa. Apesar da acidez do vinagre, os componentes voláteis podem ser percebidos pelos sentidos (Morales *et al.*, 2009; Tesfaye *et al.*, 2009).

As células sensíveis ao gosto estão unicamente localizadas na língua, em pequenas saliências designadas papilas. Beber é diferente de provar. Provar pressupõe a análise pelos

sentidos envolvidos, descrição das percepções, comparação em relação às normas conhecidas e emissão de um julgamento.

Devido à complexidade aromática dos vinagres têm sido referenciados estudos com o intuito de simplificar a sua análise sensorial, uma vez que a nível mundial ainda não é muito aplicada. Por exemplo, Morales *et al.* (2009) reuniram 13 atributos que visam descrever as sensações mais relevantes ao provar vinagres (Tabela 1). Os mesmos revelaram-se úteis mesmo no caso de uma degustação de diferentes vinagres na mesma prova.

Tabela 1 – Exemplo de atributos descritores da complexidade organoléptica de vinagres

Odor a acetato de etilo	Frutos vermelhos	Uva
Sensação pungente	Baunilha	Cítrico
Carácter vínico	Aroma doce	Impressão Geral
Amadeirado	Amêndoa amarga	
Álcool/Licor	Couro/Velho	

(Fonte: Morales *et al.* (2009))

No vinagre de vinho destacam-se como características sensoriais a cor, a intensidade aromática, o aroma amadeirado, o cheiro herbáceo, o odor frutado, o acetato etílico, o cheiro de vinho, e a sensação pungente (Mas *et al.*, 2013; Tesfaye *et al.*, 2004).

As características organolépticas são favorecidas pelo envelhecimento, devido às interações com a madeira (Callejón *et al.*, 2009), às reacções químicas, à evaporação, à produção de ésteres, às reacções entre ácidos e álcoois residuais. Isto proporciona melhores aromas, integração dos metabolitos e a redução da pungência do ácido acético (Mas *et al.*, 2014; Tesfaye *et al.*, 2009).

Os polifenóis nas uvas estão localizados em diferentes partes do fruto: a pele é rica em antocianinas e estilbenos; a parte carnuda contém principalmente ácidos fenólicos; e as sementes são compostas por flavonóides. Portanto, a composição fenólica de ambas as matérias-primas (vinho) e produto acabado (vinagre) é, por sua vez influenciada pela variedade, bem como pelo tipo de sistema de esmagamento a que as uvas são submetidas. Em geral, os aldeídos aromáticos e os taninos elágicos são extraídos durante o envelhecimento em madeira (Teskaye *et al.*, 2009). Contudo, nem todos os compostos voláteis são responsáveis pelo aroma do produto, os receptores olfactivos e o epitélio olfactivo também o são.

Numa perspectiva inovadora têm sido realizados estudos, nomeadamente em vinagres, no que diz respeito ao “tipo” de provadores, englobando equipamentos de detecção (olho

eletrónico, nariz eletrónico e língua eletrónica), e não pessoas (Ouyang *et al.*, 2014). Tal facto pode dever-se à dificuldade de apreciação de um produto como o vinagre.

1.6. Análises Físico-químicas

Juntamente com a análise sensorial, a análise instrumental é fundamental, para a obtenção de um produto de qualidade, uma vez que os processos industriais são complexos, devido à sua natureza multicomponente, mesmo com elevada automatização no seu controlo. Pretende-se de uma maneira geral evitar ou reduzir não conformidades, permitir a monitorização dinâmica dos mesmos e o controlo legislativo, por exemplo pela pesquisa de compostos implícitos na adulteração de vinagres (Morales *et al.*, 2009). Isto é geralmente conseguido pela análise de amostras de interesse no decurso do sistema, através de métodos de referência (Sáiz-Abajo *et al.*, 2006). A Tabela 2 apresenta diversos parâmetros normalmente alvo de análise, bem como os respectivos métodos com que são usualmente determinados.

Tabela 2 – Análises físico-químicas em vinagres

Método(s)	Parâmetro(s) analisado(s)
Volumetria	Acidez total
Picnometria	Álcool residual
Gravimetria	Extracto seco; Cinzas
Espectrofotometria	Fenóis totais; Antocianina total
HPLC-MS; Gravimetria	Polifenóis; Aminoácidos; Açúcares; Ácidos orgânicos; Ácidos gordos; Aminas
GC-MS	Compostos voláteis
GC-O; SBSE; HS-SPME	Perfil aromático

(Fonte: adaptado de Codex Alimentarius (2000); Tesfaye *et al.* (2009))

A determinação do perfil fenólico permite saber o tipo de matéria-prima utilizada, a variedade da uva utilizada, no caso de vinagres de vinho, o método de acetificação e a ausência ou presença de envelhecimento. Da mesma forma, o perfil aromático permite não só o conhecimento do método de envelhecimento, se utilizado, bem como a detecção de defeitos e da adulteração do vinagre (Tesfaye *et al.*, 2009).

A diluição do vinagre é uma etapa muito importante para os fabricantes de vinagre, uma vez que um erro nesta etapa pode representar uma elevada perda económica e/ou um problema se não cumprir as especificações legais.

A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) tem sido utilizada para analisar os parâmetros que influenciam a qualidade de vinagres. Esta permite a monitorização simultânea de todos os constituintes biológicos presentes no vinagre final. Desta forma este método tem-se revelado importante na autenticidade de vinagres e no cumprimento das exigências nacionais e na regulamentação do mercado externo, que é hoje em dia uma enorme tarefa competitiva (Sáiz-Abajo *et al.*, 2006). Juntamente com técnicas quimiométricas é também utilizada para controlar alterações no vinagre durante o armazenamento (Casale *et al.*, 2006).

1.6.1. Legislação

No que diz respeito aos parâmetros indicadores da qualidade de vinagres e contaminantes, a legislação difere de país para país, sendo a legislação portuguesa idêntica à europeia (Tabela 3), a internacional definida por outros limites e mais parâmetros (Tabela 4) e a brasileira particularmente “exigente” (Tabela 5). A China, por exemplo, exige ao nível do processamento de vinagres a pasteurização ao invés da sulfitação.

Segundo Laranjeira (2014) as análises físico-químicas obrigatórias em Portugal para a detecção de fraudes, ao álcool e ao ácido acético, não parecem bastar.

Tabela 3 – Legislação para vinagres em Portugal

Parâmetro		Limite	
		Mínimo	Máximo
Ácido Acético (g/100 mL)	Vinagre de vinho	6	-
	Outros	5	-
Álcool a 20 °C (% v/v)	Vinagre de vinho	-	1,5
	Outros	-	0,5

(Fonte: adaptado de Decreto de Lei nº 174 de 2007)

Tabela 4 – Legislação internacional para vinagres

Parâmetro		Limite	
		Mínimo	Máximo
Ácido Acético (g/100 mL)	Vinagre de vinho	6	-
	Outros	5	-
Álcool a 20 °C (% v/v)	Vinagre de vinho	-	0,5
	Outros	-	1
Sólidos Solúveis (g/L) - 1% ácido acético	Vinagre de vinho	1,3	-
	Outros	2,0	-
Cu, Zn, Fe (mg/kg)		-	10
As, Pb ⁴ (mg/kg)		-	1

(Fonte: adaptado de Codex Alimentarius, 2000)

Tabela 5 – Legislação para vinagres no Brasil

Parâmetro		Limite	
		Mínimo	Máximo
Ácido acético (g/100 mL)		4,0	-
Álcool a 20 °C (% v/v)		-	1,0
Cinzas (g/L)		1,0	-
Extracto Seco Reduzido (g/L)	Vinagre de Vinho Tinto	7,0	-
	Vinagre de Vinho Branco	6,0	-
Sulfato de Potássio (g/L)		-	1,0
Dióxido de Enxofre Total (mg/L)		-	200
Presença de Corantes Artificiais		Negativo	-

(Fonte: adaptado de Portaria nº 371 de 1974)

1.7. Tempo de vida útil

O tempo de vida útil de um produto alimentar está intimamente relacionado com a sua qualidade, na medida em que o torna aceitável para consumo, pelo estabelecimento de um limite aceitável (Nicoli, 2012). Este é um indicador para os consumidores do período que o alimento pode ser mantido apto para consumo, desde que as condições necessárias à sua correcta manutenção tenham sido proporcionadas. Desta forma, o alimento deve manter a sua aparência, odor, textura e sabor, de acordo com o pré-estabelecido em fábrica, e deve apresentar-se nutricionalmente apto, conforme constar no rótulo. Este período inicia-se a

⁴ Contaminantes.

partir do momento em que o produto alimentar é fabricado ou entra na cadeia alimentar, dependendo do tipo de produto.

Há alimentos que são geralmente considerados “duráveis”, e para estes o tempo de vida útil pode ser considerado indeterminado. A generalidade dos alimentos não perecíveis tem a marcação “consumir de preferência antes de” na embalagem, seguida de uma data (New Zealand Food Safety Authority, 2005). A indicação da data de durabilidade não é exigida no caso dos vinagres (Europa, 2000), e a grande maioria dos vinagres vendidos no mercado Português não apresenta data de validade.

A duração deste período depende de muitos factores, como o tipo de ingredientes que o compõem e/ou o processo de fabricação, o tipo de embalagens e a forma de armazenamento (New Zealand Food Safety Authority, 2005). O crescimento microbiano pode dar origem a deterioração do produto, intoxicação do consumidor e degradação sensorial ou bioquímica. Reacções de escurecimento e alterações químicas, que podem levar à perda de sabores, cor e/ou nutrientes podem também ocorrer, assim como a degradação por insectos, por exemplo. Factores externos como a luz e a temperatura podem causar perda de sabor, de vitaminas, de cor, podem formar precipitados e podem ainda aumentar ou diminuir a velocidade de outras formas de deterioração.

Ao longo da cadeia alimentar existem responsabilidades atribuídas a cada interveniente nesta. Os produtores devem evitar qualquer dano físico que possa resultar na deterioração da matéria-prima, por exemplo, contusões de uvas. Os fabricantes são responsáveis por determinar um prazo de validade adequado. Este deve ser baseado num estudo que considere todas as fases da cadeia de produção. Os distribuidores devem assegurar a temperatura correcta de armazenamento, a não danificação da embalagem, pois pode aumentar a vulnerabilidade à deterioração. Deve ainda ter em conta a combinação de mercadorias quer no transporte, quer no armazém, que não pode ser foco de contaminação. Por fim, os retalhistas e os consumidores finais devem ter a informação correcta acerca do armazenamento e respeitar a mesma. As instruções específicas para o modo de armazenamento devem constar no rótulo, especialmente se a embalagem selada tem influência significativa sobre a vida de prateleira do produto, que é nitidamente o caso do vinagre. À medida que o tempo de armazenamento aumenta, os indicadores de qualidade tenderão a diminuir, de forma proporcional (New Zealand Food Safety Authority, 2005).

O tempo de vida útil dos vinagres depende da sua taxa de deterioração. Este pode ser determinado directamente ou indirectamente. O método directo pressupõe um armazenamento dos vinagres em condições pré-seleccionadas de um período de tempo mais longo do que a vida de prateleira esperada e posteriormente analisando o produto em

intervalos regulares para ver quando se começa a estragar. O método indirecto compreenderá um armazenamento acelerado e/ou através de um modelo de previsão a nível microbiológico.

Laranjeira (2014) sugere que é uma boa prática o estabelecimento de um tempo de vida útil de aproximadamente 18 meses (1 ano e meio) e porque alguns vinagres são frágeis à oxidação quando expostos à luz, este deve ser reduzido até aproximadamente 1 ano.

O ponto 1.8. - Procedimento da tecnologia de produção de vinagres Gallo, por conter informação confidencial, não pôde ser impresso.

2. A GALLO

A Gallo é uma marca portuguesa que foi criada em 1919 por Victor Guedes. Pertencente ao grupo Jerónimo Martins tem fábrica localizada em Abrantes.

Com um vasto histórico de exportação, é uma Companhia que exporta para países como o Brasil, Angola, China, entre outros. É no entanto uma marca muito reconhecida no mercado português, uma vez que os seus produtos integram na nossa tradicional dieta mediterrânica, como o azeite e o vinagre.

A gama de produtos da Gallo é bastante vasta, contempla os azeites (principal produto produzido pela marca da qual se pode destacar, por exemplo, “O Meu Primeiro Azeite” (azeite para bebés) por ser uma exclusividade no mercado português), piri-piri, azeitonas e vinagres. A gama de vinagres Gallo surgiu em 2008, com o vinagre de vinho branco, de vinho tinto, de vinho tinto com aroma a framboesa, de vinho espumante, de sidra, balsâmico de Modena e condimento balsâmico branco.

Empresa certificada desde 2002 pelas Normas ISO 9001 e 14001 (relativas a qualidade e ambiente, respectivamente), aposta em produtos clássicos, com requinte, que vão de encontro à tradição familiar portuguesa, encontrando-se desta forma associada à inovação.

É no sentido de melhoria contínua da gama de produtos Gallo, que esta tese se encontra inserida na área funcional de Investigação Desenvolvimento e Inovação de produto, mais especificamente na actual gama de vinagres Gallo.

3. OBJECTIVOS

A presente Dissertação de Mestrado encontra-se inserida na área de investigação e desenvolvimento de produto e tem como intuito a análise do efeito de factores degradativos em vinagres – oxigénio e temperatura (questão pouco estudada a nível mundial).

A escolha dos vinagres de vinho, nomeadamente branco e tinto, como foco do estudo, deve-se ao facto de estes serem os mais suscetíveis microbiologicamente, por serem matérias-primas com microbiota viva e viável, merecendo portanto mais atenção.

O trabalho consistiu na identificação e análise de defeitos presentes em vinagres e na sujeição de amostras de vinagre a diferentes factores físicos.

Estes defeitos tornam-no num produto rejeitável pelos Mercados, o que numa perspectiva económica é limitante.

A avaliação dos defeitos é importante para se verificar a tolerância dos vinagres aos factores com aptidão para os degradar. Tal facto tem repercursões até no tempo de vida útil do produto.

Em termos de referências bibliográficas, têm sido referidos estudos em vinhos que abordam aspectos semelhantes desta vertente. Por serem produtos relacionáveis e semelhantes em vários aspectos, algumas analogias foram assim equiparadas.

Podem ser destacados três objectivos principais neste trabalho. O objectivo número um foi então identificar e caracterizar defeitos em amostras de vinagres. O segundo objectivo centrou-se na percepção de todo o processo de produção de vinagres e em que medida, em que etapas e que factores, podiam influenciar a qualidade do produto. Por fim, mas não menos importante, testou-se a influência especial do O_2 e da temperatura em vinagres. Neste contexto, foi avaliada a influência da exposição e restrição ao O_2 , a diferentes temperaturas (4; 23; e 31,5°C). Também foram avaliados parâmetros bioquímicos e microbiológicos inerentes.

O restante trabalho:

4. Material e Métodos

5. Resultados e Discussão

6. Conclusões e Perspectivas Futuras

8. Anexos

por conter informação confidencial, não pôde ser impresso.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTOWSKY, E., HENSCHKE, P., Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine -- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 125, 60–70 p.

BOULTON, R.B., SINGLETON, V. L., BISSON, L.F., KUNKEE, R.E., Microbiological spoilage of wine and its control. Principles and Practices of Winemaking. *Chapman & Hall*, 1996, 352–381 p.

BUDAK, N., AYKIN, E., SEYDIM, A., GREENE, A., GUZEL-SEYDIM, Z., Functional Properties of Vinegar. *Journal of Food Science*, 2014, vol. 79, 757-764 p.

CABISCOL, E., TAMARIT. J., ROS, J., Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 2000, vol. 3, 3-8 p.

CALLEJÓN, R.M., TESFAYE, W., TORIJA, M.J., MAS, A., TRONCOSO, A.M., MORALES, M.L., Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. *Food Chemistry*, 2009, vol. 113, 1252–1259 p.

CALLEJÓN, R.M., TORIJA, M.J., MAS, A., MORALES, M.L., TRONCOSO, A.M., Changes of volatile compounds in wine vinegars during their elaboration in barrels made from different woods. *Food Chemistry*, 2010, vol. 120, 561–571 p.

CASALE, M., ABAJO, M.J., SÁIZ, J.M., PIZARRO, C., FORINA, M., Study of the aging and oxidation processes of vinegar samples from different origins during storage by near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica*, 2006, Acta 557, 360-366 p.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION 162.2000, Proposed draft revised regional standard for vinegar. Rome: FAO, 5 p.

DECRETO-LEI nº 174/07. D.R. I Série. 88 (07-05-08) 2995-2997.

DIAS, J.P. - Instabilidade físico-química dos vinhos. [Projecção visual], [2012]. 32 diapositivos. Apresentação efectuada no âmbito do 54º Curso Intensivo de conservação, estabilização e engarrafamento. Acessível em Ministério da Agricultura, Lisboa, Portugal.

EBNER, H., SELLMER, S., FOLLMANN, H., Acetic acid. *Biotechnology*, 1996, vol. 6, 381-401 p.

FU, L., CHEN, S., YI, J., HOU, Z., Effects of different fermentation methods on bacterial cellulose and acid production by *Gluconacetobacter xylinus* in Cantonese-style rice vinegar. *Food Science and Technology International*, 2013, 321-331 p.

GIUDICI, P., SOLIERI, L., *Vinegars of the World*. 1st ed. Modena and Reggio Emilia: Springer, 2009. 287 p.

GULLO, M., VERZELLONI, E., CANONICO, M., Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry*, 2014, 1571–1579 p.

Heinrich Frings GmbH & Co. KG (2014). *Vinegar Technology*. Disponível em: <http://www.frings.com/>. Acesso em: 20/02/2014

Instituto Nacional de Estatística. 2013. *Estatísticas Agrícolas 2012*. Lisboa.178 p.

INSTITUTO PORTUGUÊS DO MAR E DA ATMOSFERA – Boletim Climatológico Anual – 2013 – Portugal Continental. [Projecção visual], [2014]. 4 diapositivos. Apresentação de acesso público. Acessível em IPMA, Lisboa, Portugal

INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 6/2012 D.R. I Série., 66 (12-04-04) 16.

JACKSON, R., *Wine Tasting: a Professional Handbook*. San Diego: Academic Press, 2002.

LARANJEIRA, C.M.C. Introdução à Tecnologia Vinagreira: Tipicidade e Combate à Fraude. Santarém, 2014, 25 p.

LARANJEIRA, C.M.C. - Introdução Monográfica à Indústria Vinagreira. Aproveitamento de Vinhaços de Aguardentes Vínicas em Acetificação: Um Valor de Opção para a Indústria Vinagreira. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa – IST, ISA, ISEG, FMV, 1998. 254 p. Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

LARANJEIRA, C.M. - Tecnologia Vinagreira (Produto, Indústria e Tecnologia, Qualidade e Tradição). [Projecção visual], [2014]. 75 diapositivos. Apresentação efectuada no âmbito do II

Curso de Tecnologia Vinagreira. Acessível em Instituto Politécnico de Santarém - Escola Superior Agrária, Santarém, Portugal.

LARANJEIRA, C.M.C. *Vinagre - Qualidade e Tradição: Caracterização e Evolução na Indústria Vinagreira*. Santarém, 2014, 13 p.

MACIAS, M., CARO, I., CANTERO, D. Optimum operating conditions in closed-system industrial acetifiers (semi-continuous operation): a study by computer simulation. *Chemical Engineering Science*, 1997, vol. 65, 201-207 p.

MADIGAN, M.T., & MARTINKO, J.M., Prokaryotic diversity: the bacteria. *In Brock Biology of Microorganisms*, 2006, 355-358 p.

MAMLOUK, D., GULLO, M., Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 2013, vol. 53, 377-383 p.

MAS, A., TORIJA, M., GARCÍA-PARRILLA, M., TRONCOSO, A. Acetic Acid Bacteria and the Production and Quality of Wine Vinegar. *The Scientific World Journal*, 2014, vol. 16, 1–6 p.

MATSUSHITA, K., TOYAMA, H., ADACHI, O. Respiratory chains in acetic acid bacteria: membrane bound periplasmic sugar and alcohol respirations. *Springer*, 2004, 81-99 p.

NEW ZEALAND FOOD SAFETY AUTHORITY, *A Guide to Calculating the Shelf Life of Foods*. 1st ed. Wellington, New Zealand: NZFSA, 2005. 27 p.

NP 13188.2008, Vinagre – Produto fabricado a partir de líquidos orgânicos de origem agrícola: definições, características, marcação. Lisboa: IPQ, 12 p.

OUYANG, Q., ZHAO, J., CHEN, Q., Instrumental intelligent test of food sensory quality as mimic of human panel test combining multiple cross-perception sensors and data fusion. *Analytica chimica acta*, 2014, vol. 1016.

PETSIU, E.I., MITROU, P.I., RAPTIS, S.A., DIMITRIADIS, G.D., Effect and mechanisms of action of vinegar on glucose metabolism, lipid profile, and body weight. *Nutrition Reviews*. 2014, 651-661 p.

PORTARIA nº 371/74 D.R. I Série. 67-69.

RECOUVREUX, Derce de Oliveira Souza - Produção de Celulose Bacteriana: Identificação do Operon bcs e Produção de Biofilme Celulósico por *Chromobacterium violaceum*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. 107. Tese de mestrado.

SCHLEPÜTZ, T., GERHARDS, J., BÜCHS, J., Ensuring constant oxygen supply during inoculation is essential to obtain reproducible results with obligatory aerobic acetic acid bacteria in vinegar production. *Process Biochemistry*, 2013. vol. 48, 398-405 p.

SENGUN, I., KARABIYIKLI, S., Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 2011. vol. 22, 647-656 p.

SUGIYAMA, A., SAITOH, M., TAKAHARA, M., SATOH, Y., HASHIMOTO, K., Acute cardiovascular effects of a new beverage made of wine vinegar and grape juice, assessed using an in vivo rat. *Nutrition Research*, 2003, vol. 23, 1291–1296 p.

SUTHERLAND, I.W., Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 2001, vol. 147, 3-8 p.

TEH, K., FLINT, S., PALMER, J., ANDREWES, P., BREMER, P., LINDSAY, D. Biofilm – An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *International Dairy Journal* 2014, vol. 34, 32-40 p.

TESFAYE, W., MORALES, M.L., CALLEJÓN, R.M., CEREZO, A.B., GONZÁLEZ, A.G., GARCÍA-PARRILLA, M.C., TRONCOSO A.M., Descriptive sensory analysis of wine vinegar: tasting procedure and reliability of new attributes. *Journal of Sensory Studies*, 2010, 216-228 p.

TESFAYE, W., MORALES, M.L., GARCÍA-PARRILLA, M.C., TRONCOSO, A.M., Improvement of Wine Vinegar Elaboration and Quality Analysis: Instrumental and Human Sensory Evaluation, *Food Reviews International*, 2009, vol. 25, 142-156 p.

The Nielsen Company. 2010. *Anuário Nielsen: Food*. Portugal. 395 p.

TORSVIK, V., GOKSOYR, J., DAAE, F.L. High diversity of ADN of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, vol. 56, 782-787.

YANG, X.Y., HUANG, C., GUO, H.J., XIONG, L., LUO, L., WANG, B., CHEN, X.F., LIN, X.Q., CHEN X.D., Beneficial Effect of Acetic Acid on the Xylose Utilization and Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Indian Journal of Microbiology*, 2014, vol. 54, 268-273 p.

ZANDIM, D., CORRÊA, F., SAMPAIO, J., JÚNIOR, C., The influence of vinegars on exposure of dentinal tubules: a SEM evaluation. *Brazilian Oral Research*, 2004, vol. 10