

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE ACETOÍNA EM VINAGRES COMO
FORMA DE VERIFICAÇÃO DE SUA GENUINIDADE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, projeto FUNCITEC, do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Co-Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Rosier

SONIA YASUKO TAKEMOTO

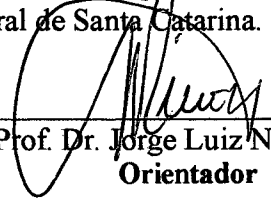
**FLORIANÓPOLIS – SC
2000**

Avaliação do Teor de Acetoína em Vinagres como Forma de Verificação de sua Genuinidade

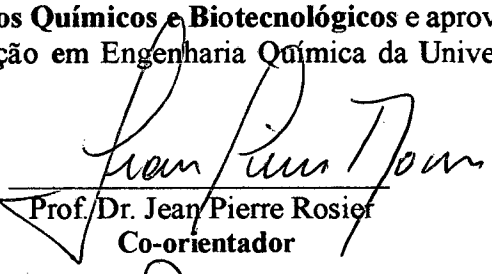
Por

Sonia Yasuko Takemoto

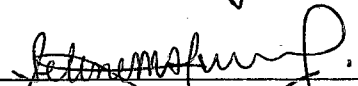
Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.



Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Orientador




Prof. Dr. Jean Pierre Rosier
Co-orientador




Prof.ª Dr.ª Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza
Coordenadora do CPGENQ

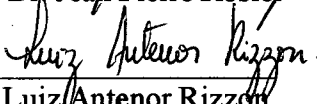
Banca Examinadora:




Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow



Prof. Dr. Jean Pierre Rosier



Dr. Luiz Antenor Rizzon



Prof.ª Dr.ª Gláucia Maria Falcão de Aragão

Florianópolis, 20 de Outubro de 2000

À minha filha, Luiza, por toda a luz que trouxe a minha vida e ao meu marido, Lautenay, pelo seu amor e sua paciência, com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Jorge Luiz Ninow e Jean Pierre Rosier pela amizade e orientação durante a realização dos trabalhos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, em especial ao Edivilson, pelo apoio e atenção.

Ao Laboratório de Vinhos da Cantina Experimental da EPAGRI – Videira por permitir a realização deste trabalho e em especial, à Thaís por sua preciosa colaboração e pelos bons momentos juntos.

À minha mãe, pelo apoio e confiança em mim depositados.

Ao meu pai, pelo exemplo e pelos ensinamentos que sempre me acompanham.

À amiga Janice Isabel Druzian pela sua amizade e incentivo.

Ao senhor Willians Thadeu Carnevalli pela colaboração e atenção.

À CAPES e ao FUNCITEC pelo apoio ao Programa Plano Sul de Pós-Graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Histórico	3
2.2 Definição e tipos de vinagres	5
2.3 Processos de fabricação	7
2.3.1 Processo de Orleans	8
2.3.2 Processo alemão	9
2.3.3 Processos submersos	11
2.3.4 Processamento final do vinagre	13
2.4 Bactérias acéticas	14
2.4.1 Metabolismo das bactérias acéticas	15
2.5 Composição do vinagre	17
2.5.1 Ácido acético	19
2.5.2 Álcool etílico (etanol) residual	20
2.5.3 Extrato seco	20
2.5.4 Cinzas	21
2.5.5 Acetoína	21
2.5.5.1 Biossíntese de acetoína em leveduras	21

2.5.5.2	Biossíntese de acetoína em bactérias acéticas	22
2.5.5.3	Fatores que afetam a produção de acetoína	25
2.5.5.4	Concentração de acetoína em vinhos	26
2.5.5.5	Teores de acetoína em vinagres	27
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Produção de vinagres	29
3.1.1	Matérias-primas	29
3.1.1.1	Vinhos	29
3.1.1.2	Álcool	29
3.1.2	Microrganismos	29
3.1.3	Fermentação acética	29
3.1.3.1	Caldas	30
3.1.3.2	Remontagens	33
3.1.3.3	Manutenção da produção de vinagre e processamento final do vinagre	33
3.2	Métodos analíticos	35
3.2.1	Amostragem	35
3.2.2	Análises físico-químicas	35
3.2.3	Análises cromatográficas	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
4.1	Artigo 1: Estudo de características físico-químicas de vinagres durante a fermentação acética	44
4.2	Artigo 2: Caracterização analítica de vinagres brasileiros	65
4.3	Artigo 3: Teor de acetoína em vinagres	74
5.	CONCLUSÕES	91

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Recipiente usado no processo de Orleans para produção de vinagre de vinho (AQUARONE <i>et al</i> , 1983)	08
Figura 2.2 – Gerador para produção de vinagre com recheio (AQUARONE <i>et al</i> , 1983).....	10
Figura 2.3 – Acetificador Frings em aço inoxidável (MECCA, 1979)	12
Figura 2.4 – Esquema da oxidação do etanol pelo <i>Acetobacter</i> , proposto por Nakayama (LLAGUNO & POLO, 1991).....	16
Figura 2.5 – Principais vias metabólicas do metabolismo oxidativo nas bactérias acéticas (LLAGUNO & POLO, 1991)	17
Figura 2.6 – Esquema da biossíntese de acetoína em leveduras (ROMANO & SUZZI, 1996)	24
Figura 2.7 – Síntese da acetoína por bactérias (CARVALHO, 1999; de REVEL, 1992)	25
Figura 3.1 – Fermentador com vinho tinto no início da fermentação	31
Figura 3.2 – Fermentador com solução de álcool no início da fermentação	32
Figura 3.3 – Vinagre de vinho branco após remontagens	34
Figura 3.4 – Mãe do vinagre em formação	34
 Capítulo 4 – Resultados e Discussões	
Artigo 1:	
Figura 1 – Vinagres produzidos em laboratório	55
Artigo 2:	
Figura 3.1 – Comparação entre os teores de extrato seco dos diferentes tipos de vinagres analisados	70
Artigo 3:	
Figura 3.1 – Teores de acetoína nos vinagres produzidos experimentalmente	82
Figura 3.2 – Distribuição das amostras de vinagres de vinho nacionais conforme seu teor de acetoína	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Tipos de vinagres (LLAGUNO & POLO, 1991)	7
Tabela 2.2 – Composição química do vinagre de vinho (MECCA <i>et al</i> , 1979)	18
Tabela 2.3 – Concentrações de acetoína em vinhos de diferentes países (ROMANO & SUZZI, 1996)	27

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

Artigo 1:

Tabela 1 – Características dos vinhos utilizados para acetificação	53
Tabela 2 – Características físico-químicas do vinagre de vinho tinto produzido	56
Tabela 3 – Características físico-químicas do vinagre de vinho branco produzido ...	56
Tabela 4 – Características físico-químicas do vinagre de álcool produzido	59
Tabela 5 – Teores de acetoína nos vinagres produzidos	60

Artigo 2:

Tabela 3.1 – Análises físico-químicas das amostras de vinagres comerciais de vinho tinto	67
Tabela 3.2 – Análises físico-químicas das amostras de vinagres comerciais de vinho branco	68
Tabela 3.3 – Análises físico-químicas das amostras de vinagres comerciais de álcool	68
Tabela 3.4 – Teores de acetoína nas amostras de vinagres comerciais	71
Tabela 3.5 – Percentuais das amostras analisadas conforme seu teor de acetoína	71

Artigo 3:

Tabela 3.1 – Teores de acetoína nas amostras de vinagres comerciais	84
---	----

RESUMO

O vinagre é um produto obtido a partir da fermentação acética de substratos alcoólicos de origem agrícola onde o aspecto mais importante nesse processo é a oxidação biológica do etanol a ácido acético. Porém, outras substâncias em menores concentrações, também sofrem transformações ou são formadas, fornecendo ao produto final características típicas e definitivas para sua qualidade. Em alguns casos, a presença ou não destes compostos pode ser associada à origem e genuinidade dos vinagres. Um desses compostos é a acetoína.

A acetoína é um produto comumente produzido em processos fermentativos tanto por leveduras como por bactérias e, juntamente com o diacetil e 2,3-butanodiol são importantes componentes do aroma de uma vasta gama de produtos lácteos, tais como queijos e manteiga.

O teor de acetoína encontrado em vinhos geralmente é baixo e sua presença, neste caso, não é muito desejada principalmente por tratar-se de uma substância derivada do diacetil o qual apresenta forte odor característico. Nos vinagres, o teor de acetoína encontrado é bastante superior ao dos vinhos e sua determinação está associada com a qualidade do produto, sendo um procedimento comum em países de produções tradicionais, como a Espanha e Itália. No Brasil, não há trabalhos publicados que mostrem os valores encontrados em vinagres comerciais nacionais.

Utilizando-se um processo artesanal adaptado, produziu-se vinagres a partir de vinhos tinto e branco e de soluções alcoólicas, com o propósito de observar algumas características físico-químicas importantes para o produto final. Através de cromatografia gasosa, acompanhou-se a formação e concentração de acetoína nesses produtos com o objetivo de associar a presença deste composto à origem do vinagre.

Uma caracterização utilizando-se os mesmos parâmetros também foi realizada sobre uma amostragem de vinagres comerciais.

Para os vinagres produzidos em laboratório, os resultados evidenciaram diferenças entre os produtos obtidos a partir de vinho e os vinagres de álcool, principalmente no teor de extrato seco e cinzas. Os teores de acetoína encontrados estão de acordo com os valores comumente citados na bibliografia, sendo maior para o vinagre de vinho tinto. O vinagre de álcool produzido não apresentou teores de acetoína detectáveis.

Observou-se uma grande variabilidade nas características físico-químicas principalmente para as amostras comerciais de vinagres de vinho. As amostras comerciais de vinagres de álcool apresentaram teores de extrato seco e cinzas menores que as amostras de vinagres de vinho.

As amostras de vinagres de vinho comerciais nacionais analisadas apresentaram valores de acetoína variando entre 4,71 e 437,43 mg/L e as amostras de vinagres de álcool comerciais apresentaram teores de acetoína em uma faixa mais baixa, entre 0 e 21,90 mg/L.

Os objetivos propostos foram satisfatoriamente atingidos pois foi possível verificar que os vinagres obtidos a partir de vinho apresentam teores consideráveis de acetoína o mesmo não ocorrendo com vinagres obtidos a partir de soluções alcoólicas. A constatação de uma grande variabilidade nas características físico-químicas dos vinagres comerciais nacionais analisados reforça a necessidade do estabelecimento de parâmetros mais específicos para o controle da qualidade desses produtos. Conclui-se ainda que a análise por cromatografia gasosa do teor de acetoína em vinagres é bastante eficaz para a verificação da genuinidade de vinagres de vinho.

ABSTRACT

Vinegar is a product obtained from acetic fermentation of alcoholic substrates from agricultural origin and the most important aspect in this process is the biological oxidation of ethanol to acetic acid. However, other substances are also formed or transformed, at lower concentrations, which endow the final product with characteristic features important to its quality. In some cases, the presence or not of these substances in the product, can be related to the origin and authenticity of vinegar. One of these substances is acetoin.

Acetoin is a common product of fermentative processes in yeasts and bacteria. Acetoin, associated with diacetyl and 2,3-butanediol, is an important compound in the flavor of several dairy products such as cheeses and butter.

The acetoin content in wines is generally low and its presence is undesirable since it is a substance derived from diacetyl, which presents a strong and characteristic odor. In vinegars, acetoin content is much higher and its determination, which is associated with the product quality, is a common procedure in amongst traditional producers of wine vinegars in countries such as Spain and Italy. At present, there is no literature that reports acetoin content in Brazilian vinegars.

By means of an adapted manufacturing process, vinegars were produced from red and white wines and alcoholic solutions, with the purpose of monitoring certain physico-chemical characteristics important to the final product. The formation and concentration of acetoin, through a practical method of gas chromatography, were investigated and the results were related to the origin of vinegar. Samples of commercial vinegars were analyzed in the same parameters.

The results showed differences between vinegars produced from wines and vinegars produced from alcohol, especially in dry extract and ash content. Acetoin content found is in agreement with acetoin contents commonly reported in papers, being higher for red wine vinegar. Alcohol vinegar produced in lab did not present detectable acetoin.

A large variation in physico-chemical characteristics, especially for commercial samples of wine vinegar, was noted. Samples of commercial alcohol vinegars showed dry extract and ash content lower than wine vinegar samples.

The commercial samples of Brazilian wine vinegars analyzed presented acetoin concentrations between 4.71 and 437.43 mg/L and the commercial samples of alcohol vinegars presented acetoin concentrations at a lower level, between 0 and 21.90 mg/L.

The aims of this work were reasonably reached since it was possible to verify that vinegars produced from wines contain considerable acetoin content, which is not true for vinegars produced from alcoholic solutions. The large variation of physico-chemical characteristics of the commercial samples of vinegars shows the need of more specific standards that could help in the quality control of these products. It is possible to conclude that acetoin content analysis by gas chromatography is very efficient to prove wine vinegar authenticity.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O vinagre de vinho é um produto alimentício classificado como condimento, obtido a partir da fermentação acética de vinhos, que deve conter uma acidez volátil mínima de 4%, expressa em ácido acético, seu principal componente, conforme a legislação em vigor.

Um dos principais problemas para a indústria de vinagre de vinho, brasileira e de diversos países onde se utiliza vinho como matéria-prima, é a adulteração dos vinagres através da adição de soluções diluídas de ácido acético ou através de misturas com outros fermentados acéticos provenientes de matérias-primas que não o vinho.

Obviamente, o rendimento obtido com essas adulterações permite a comercialização de produtos mais baratos, levando a uma concorrência comercial desleal com os vinagres produzidos a partir de vinho. Outra consequência ruim para os produtores de vinagres de vinho é a desqualificação do produto frente à concorrência com vinagres procedentes de outras matérias-primas, isto é, um produto adulterado não apresenta as características próprias que diferenciam os vinagres de vinho de outros tipos de vinagres, tais como sabor e aroma peculiares. O fato de vinagres adulterados serem comercializados e utilizados como sendo de vinho acabam por difundir características distorcidas e conseqüentemente, formar uma falsa imagem do produto.

A detecção da adição fraudulenta de ácido acético diluído ou de misturas com outros tipos de fermentados acéticos dos vinagres de vinho comerciais não é fácil. Pode-se dizer que praticamente não se consegue detectar tal fraude por análises físico-químicas simples. Diversas pesquisas têm sido realizadas nesse sentido mas nenhum resultado conclusivo foi publicado ainda. Os resultados mais recentes mostram que a análise do isótopo de carbono 14 é uma forma eficaz capaz de detectar as alterações nos vinagres.

Além desses métodos, que necessitam de equipamentos mais sofisticados em laboratórios de análises, a adulteração de vinagres pode ser razoavelmente avaliada pelas alterações causadas na concentração de seus componentes fundamentais, isto é, há uma relativa alteração de outras características do produto, tais como acidez fixa, extrato seco, teor de cinzas e outros componentes de menores teores, como os ésteres, aldeídos, cetonas, aminoácidos, quando comparados com vinagres produzidos a partir de vinhos, sem nenhuma adição de ácido acético sintético ou mistura com outros fermentados acéticos.

Diversas outras análises de componentes do vinagre existem e tentam estabelecer relações entre sua concentração e a qualidade comprovada do produto. Entre elas está a determinação do teor de acetoína.

Um dos compostos voláteis encontrados em bebidas alcoólicas procedentes de fermentação e em vinagres, é a acetoína (3-hidroxi 2-butanona), substância produzida por leveduras e bactérias durante os processos fermentativos.

Pequenas quantidades de acetoína existem nos vinhos. Pesquisas mostram que esses teores não ultrapassam a 15 mg/L, teores não comparáveis com os encontrados em vinagres que podem chegar a 1 g/L.

A avaliação da presença e teor de acetoína em vinagres de vinho de procedência conhecida, por meio do estabelecimento de uma relação entre essas concentrações e sua matéria-prima de origem, pode auxiliar na caracterização de vinagres de vinho comerciais, a fim de comprovar sua origem e qualidade.

O objetivo principal deste trabalho é estudar a formação de acetoína em vinagres procedentes da fermentação de vinhos e de álcool e verificar a eficácia da análise do teor de acetoína em vinagres, através de uma análise de cromatografia gasosa de metodologia simples e rápida, como uma forma para determinar sua procedência.

Objetiva-se ainda a realização de um estudo para a caracterização dos vinagres de vinho e de álcool nacionais comercializados e de vinagres produzidos em escala laboratorial, a fim de se obter dados para um melhor conhecimento das características desses produtos, já que pouquíssimas informações existem sobre os mesmos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

O vinagre, assim como o vinho, é um alimento conhecido desde a Antigüidade e seu nome, em quase todas as línguas ocidentais (com exceção do italiano, *aceto* do latino “*acetum*”, e do alemão, *essig*), provém do francês, *vinaigre*, ou vinho azedo (RIZZON, & MIELE, 1998; LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979). Entre suas principais aplicações, encontra-se seu uso como condimento e conservante na alimentação humana.

Originalmente, o vinagre era obtido não só de vinhos mas também de cervejas deixados ao ar, isto é, formava-se por fermentação espontânea (AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979). A fermentação alcoólica seguida da acética se produz espontaneamente sobre qualquer substrato açucarado exposto ao pó e aos insetos que transportam leveduras e bactérias. A acetificação também se realiza espontaneamente em vinhos e sidras de baixo teores de álcool expostos ao contato com o ar.

Acredita-se que uma das referências mais antigas sobre o vinagre sejam as citadas na cultura babilônica (5.000 anos antes de Cristo) sobre o processo de obtenção do vinagre de tâmaras (LLAGUNO & POLO, 1991). A história do vinagre é cercada de lendas de personagens históricos. Segundo Cayo Plínio II, em sua *Historia Natural*, a rainha egípcia para ganhar uma aposta, gastar um milhão de sestércios em uma comida, dissolveu perólas valiosas em vinagre e as bebeu (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983).

O ácido acético contido no vinagre foi durante séculos o ácido mais forte de que se dispunha. Para a obtenção de vinagre concentrado, utilizava-se a destilação, a qual sabe-se que Geber, célebre alquimista árabe, já havia feito por volta dos anos 760 – 800 (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983). Até por volta de 1300, quando se descobriu o ácido sulfúrico, não existia um ácido com maior poder de dissolução que o acético.

O vinagre era usado com diversas funções, mesmo não se conhecendo seu princípio ativo. Como por exemplo, quando um boi quebrava seu chifre, recomendava-se o uso de um lenço empapado em sal, vinagre e azeite para eliminar os resíduos de sangue (LLAGUNO & POLO, 1991). Os soldados romanos recebiam sempre um pequeno volume de vinagre para que durante suas viagens, usassem na água antes de ingeri-la, evitando assim doenças

provocadas por águas contaminadas já que o baixo pH eliminava grande parte das bactérias patogênicas (MECCA *et al*, 1979).

A limpeza de feridas e chagas por vinagre diluído e sua aplicação na desinfecção do ouvido externo são aplicações conhecidas há muito tempo. Durante as epidemias de peste ou de cólera que arrasaram a Europa no século passado, há decretos dos governos para que todas as frutas e hortaliças fossem lavadas em vinagre antes de seu consumo (LLAGUNO & POLO, 1991; MECCA *et al*, 1979).

O uso de uma mistura de mel e vinagre no alívio das tosses foi recomendado por Galeno e atribuí-se a Hipócrates o uso de vinagre nos remédios contra as doenças respiratórias (LLAGUNO & POLO, 1991; MECCA *et al*, 1979). O uso como antídoto para as picadas de insetos que injetam substâncias alcalinas é um conhecido remédio caseiro utilizado ainda hoje.

Diversos estudiosos se interessaram pelo estudo do vinagre ainda que, somente no século XVIII, alguns resultados mais próximos da realidade tenham sido publicados.

O holandês Boerhaave, em 1732, observou que a chamada “mãe do vinagre” era um organismo vivo, mesmo sem explicar qual seu papel na fermentação acética. Lavoisier, em seus estudos sobre fermentações publicados em 1789, reconhece em seu *Traité elementaire de Chimie*, a necessidade do ar para a acetificação do vinho. Em 1822, Döbereiner comprovou que o álcool absorve o oxigênio, produzindo água e ácido acético (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983).

Já em 1837, Kützing, um botânico alemão, relatara em uma conferência, suas experiências sobre a “mãe do vinagre”, onde declarava ter observado, na película que recobre a superfície do líquido acidificado, glóbulos seis vezes menores que as leveduras, unidos por um revestimento viscoso que chegava a formar uma grossa membrana (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; CARBONELL, 1970).

Berzélius, um dos químicos mais prestigiados do século XVIII, apesar de reconhecer que a substância mucilaginosa chamada “mãe do vinagre”, tinha influência na produção do vinagre não a reconhecia como causa da fermentação acética, já que para ele, o vinagre era produzido a partir do ácido acético residual agregado à massa viscosa depositada nos barris. Isto ele demonstrava através da lavagem cuidadosa dos barris, os quais, segundo ele, desprovidos de ácido acético, não produziam o vinagre (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; CARBONELL, 1970).

Somente em 1861, Pasteur em sua *Communication a la Société Chimique de Paris* (Seção 26/7/1861) descreve sua experiência para mostrar que sem a presença de um ser vivo, segundo ele, *Mycoderma aceti*, não ocorre a acetificação.

Em sua *Memoire sur la fermentation acetique*, publicada em 1864, nos *Annales Scientifiques de l'Ecole Normale Supérieure de Paris*, Pasteur reafirmava a necessidade de um “ser organizado” sem o qual um líquido alcoólico, vinho ou cerveja, mesmo que adicionado de sucos de frutas, água de cevada, ácido acético ou outros substratos, em contato com o ar, não seriam acidificados sem o desenvolvimento de mycodermas, capazes de fixarem o oxigênio do ar “fazendo a combustão a um grau mais ou menos avançado das matérias dissolvidas, sobretudo do álcool e do ácido acético” (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; CARBONELL, 1970).

Liebig contestava essa afirmação e defendia a idéia de que a transformação de etanol em ácido acético não passava de um processo exclusivamente químico, de ordem catalítica. Segundo Liebig, eram as substâncias nitrogenadas do vinho que permitiam ao álcool absorver oxigênio, sendo a reação absolutamente semelhante àquela que leva à formação de ácido sulfúrico no método das câmaras de chumbo, a partir do sulfito de sódio. Afirmava ainda que o álcool não continha os elementos nutritivos necessários ao crescimento do *Mycoderma*, já que no processo de fabricação de vinagre na Alemanha, não se adicionava nada ao álcool diluído. Pasteur argumentava que a água comum utilizada para a diluição do álcool, continha os sais necessários para o crescimento do *Mycoderma aceti* e propôs também um experimento definitivo, colocando água fervente durante meia hora ou mais nos tonéis da fábrica de vinagre alemã, antes de usá-los para a fabricação de vinagres. Liebig não contestou esta proposta (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; CARBONELL, 1970).

2.2 DEFINIÇÃO E TIPOS DE VINAGRES

Pela definição da palavra vinagre, vinho azedo, somente os procedentes do vinho mereceriam esta denominação. Por extensão, denominam-se vinagres a todos os produtos resultantes da fermentação acética de diversos substratos alcoólicos, adicionando ao nome do vinagre o do substrato correspondente.

O Codex Alimentarius define o vinagre como “um líquido, apto para consumo humano, produzido exclusivamente a partir de matérias-primas de origem agrícola, que contenham amido ou açúcares ou amido e açúcares, por um duplo processo de fermentação: alcoólica e

acética” (16ª Sessão, Genebra, 1985). Os vinagres devem conter quantidades determinadas de ácido acético (ANEXO I) e ingredientes opcionais tais como ervas, especiarias, sal e outros, conforme especificação do Codex Alimentarius, em quantidades suficientes para conferir um sabor e aroma peculiares.

As matérias-primas agrícolas utilizadas são muito diferentes principalmente nos países onde não se cultiva a uva, como por exemplo, na Suécia, Grã-Bretanha, Finlândia, Irlanda, ou onde o cultivo de uva não é significativo, onde então, os chamados “vinhos de frutas” são utilizados como matérias-primas para a produção de vinagres (RIZZON & MIELE, 1998; LLAGUNO & POLO, 1991).

A legislação brasileira define como vinagre de vinho, o produto obtido da fermentação acética do vinho (BRASIL, 1990, 1988) que deve conter uma acidez volátil mínima de 40 g por litro expressa em ácido acético (4%). Sua graduação alcoólica não pode exceder a 1ºGL e deve ser obrigatoriamente estabilizado. Um vinagre com mais de 80 g por litro de acidez volátil é o concentrado de vinagre usado exclusivamente para diluição (BRASIL, 1990).

Especificam-se ainda as seguintes características organolépticas para os vinagres (BRASIL, 1974) (ANEXO II):

Aspecto: líquido, límpido e sem depósito

Cor: de acordo com a matéria-prima que lhe deu origem

Cheiro: característico

Sabor: ácido.

A mesma legislação permite que sejam usadas genericamente outras substâncias ou líquidos alcoólicos para a fermentação acética, desde que ao produto resultante seja acrescido o nome da matéria-prima após o termo vinagre (BRASIL, 1990). No Brasil, não é permitida a fabricação e venda de vinagre artificial, isto é, vinagre produzido a partir da diluição do ácido acético obtido a partir da síntese do etileno ou da destilação seca da madeira (BRASIL, 1990).

As legislações internacionais têm apresentado diversas propostas para especificações dos vinagres baseados em estudos dos tipos de vinagres mais usados. A nível mundial, os vinagres são classificados da seguinte forma:

Tipo de vinagre	Características
Vinagre de vinho	-obtido a partir da fermentação acética do vinho; comum nos países vinícolas
Vinagre de vinho envelhecido	-vinagre envelhecido em barris de madeira os quais apresentam aromas distintos ao final de sua fabricação
Vinagre de malte	-obtido a partir de malte; comum na Grã-Bretanha e Estados Unidos
Vinagre de sidra	-obtido a partir do suco de maçã que sofreu uma fermentação alcoólica
Vinagre de álcool	-obtido mediante a fermentação acética de soluções aquosas de álcool procedente principalmente de matérias agrícolas
Vinagre balsâmico de Modena	-obtido a partir do mosto de uva branca da variedade Trebbiano, em ótimo grau de maturação; é um processo lento de fermentação desenvolvido em diversos barris de diferentes tipos de madeira; a legislação italiana prevê um envelhecimento mínimo de 12 anos e, 50 anos para que tenha um flavor próprio para ser dito <i>de Modena</i>

Tabela 2.1 – Tipos de Vinagres (LLAGUNO & POLO, 1991)

2.3 PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

Antes de se conhecer os microrganismos e sua forma de atuação, o vinagre era produzido de forma empírica, utilizando-se vinhos em países vinícolas como a França e Itália, álcool na Alemanha ou o arroz na China e no Japão (LLAGUNO & POLO, 1991).

Os métodos artesanais ainda hoje são utilizados para produção doméstica de vinagres em pequenas quantidades. Tais métodos não necessitam de grandes técnicas para sua utilização e consistem basicamente em deixar, por um longo tempo, geralmente num barril, um bom vinho adicionado de um vinagre turvo ou da “mãe do vinagre”. É um processo lento e a acetificação se dá pelo contato do substrato alcoólico com o ar, por meio das bactérias acéticas, agregadas por um polímero produzido pelos próprios microrganismos, que constituem a chamada “mãe do vinagre”. O produto obtido contém normalmente de 4 a 5 % de ácido

acético e teor alcoólico semelhante. Estes vinagres artesanais apresentam ainda aroma e sabores peculiares devido ao método de fabricação empregado (LLAGUNO & POLO, 1991; MECCA *et al*, 1979).

Os principais processos industriais utilizados para a fabricação de vinagres são baseados nos métodos de Orleans, Alemão e submerso.

2.3.1 Processo de Orleans

A França, utilizando o chamado método de Orleans fabricou e exportou muito vinagre para a Grã-Bretanha antes que esta conseguisse obter vinagre a partir de malte, sidra ou álcool. A principal indústria vinagreira francesa dessa época (século XVII) ficava em Orleans e daí o nome usado para denominar esse processo (LLAGUNO & POLO, 1991).

O processo também conhecido como lento, superficial ou estacionário, é o mais antigo usado para a produção de vinagres e consiste em deixar a acetificação do vinho por meio de uma película mantida na superfície do líquido.

A Figura 2.1 esquematiza os recipientes utilizados para a obtenção de vinagre de vinho por esse processo.

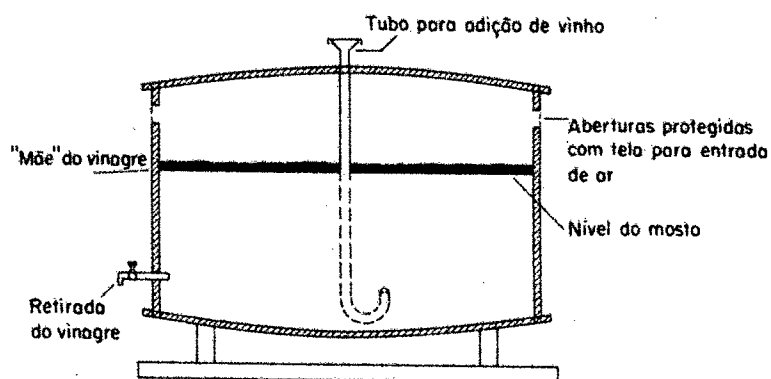


Figura 2.1 – Recipiente usado no processo de Orleans para a produção de vinagre de vinho (AQUARONE *et al*, 1983)

Dornas de madeira de cerca de 200 litros de capacidade, colocadas deitadas e superpostas, providas de duas aberturas nas extremidades cobertas com tecido e um tubo em forma de J até o fundo são utilizadas para esse processo (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979). As aberturas laterais permitem a entrada de ar

necessário para a oxidação acética mas impede a entrada de insetos e outros corpos estranhos. O tubo em forma de J serve para a adição de vinhos sem ruptura da película sobre o líquido (“mãe do vinagre”) ou movimentação de partículas já decantadas.

O processo é iniciado adicionando-se ao barril, cerca de um terço de sua capacidade de vinagre não-pasteurizado e de boa qualidade, contendo, portanto, as bactérias acéticas ativas. Semanalmente, adicionam-se alguns litros de vinho. Após a quinta semana, quando dois terços da capacidade do barril estiver preenchido, inicia-se a retirada do vinagre, adicionando-se igual quantidade de vinho. Repetindo-se semanalmente esta operação, torna-se o processo, semi-contínuo (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979).

O vinagre retirado não deve conter mais que 7,8 g de álcool por litro (1°GL) e, caso o teor de álcool esteja mais alto, deve-se aguardar mais alguns dias de fermentação (AQUARONE *et al*, 1983).

A temperatura ambiente para este processo não deve exceder 30°C, evitando-se assim perdas de álcool por evaporação. Todas as entradas e janelas do prédio, assim como as aberturas do barril, devem ser protegidas com telas finas para evitar a presença de moscas e outros insetos que são atraídos pelos odores do vinagre (AQUARONE *et al*, 1983).

Quando cuidadosamente conduzido, o processo descrito produz vinagre de muito boa qualidade, praticamente límpido, dispensando clarificações e filtrações. Entretanto, é um processo que ocupa muito espaço e de baixa produtividade, sendo inviável comercialmente e usado praticamente só na produção doméstica de vinagre.

2.3.2 Processo Alemão

Segundo LLAGUNO & POLO (1991), os processos rápidos se iniciaram com o holandês Boerhaave, a quem se atribui a construção do primeiro acetificador com recheio para acelerar a acetificação, ainda no começo do século XVIII. Schützenbach, em 1832, introduziu na Alemanha um acetificador aperfeiçoado dessa idéia, usando um barril perfurado e como recheio raspas de madeira. Um fundo falso permitia recolher o líquido e devolvê-lo à parte superior quantas vezes fossem necessárias até se atingir a acidez desejada. Nesse processo, a mistura de vinho e vinagre cai da parte superior para a parte inferior, atravessando os interstícios do recheio, o qual contém as bactérias acéticas que promovem a acetificação. O ar que penetra pelos orifícios tende a subir ao aquecer-se pelo calor desprendido pelo processo de transformação de etanol em ácido acético. Esse processo é mais rápido que o de Orleans e

era usado, principalmente para a produção de vinagre de álcool (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983).

O equipamento é conhecido por gerador de vinagre ou vinagreira, de construção normalmente em madeira, embora possa ser usado aço inoxidável, alvenaria ou outro material que não seja atacado pelo ácido acético ou confira propriedades estranhas ao vinagre. Os geradores normalmente possuem altura igual a duas vezes o diâmetro e capacidade de 100 a 100000 litros (AQUARONE *et al*, 1983). São constituídos por três câmaras ou compartimentos principais, conforme o esquema apresentado a seguir, na Figura 2.2.

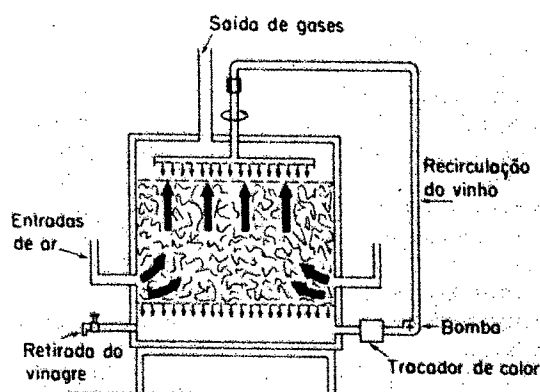


Figura 2.2 – Gerador para produção de vinagre com recheio (AQUARONE *et al*, 1983)

A câmara superior tem a função de distribuir uniformemente a mistura em acetificação sobre o material de enchimento contido na câmara intermediária, de maior dimensão entre as três. A câmara inferior funciona como depósito de líquido, de onde é recirculado para a câmara superior a fim de completar a acetificação, ou é retirado como vinagre bruto para clarificação, pasteurização e envase (AQUARONE *et al*, 1983).

O material de enchimento, contido na câmara intermediária, deve possuir grande superfície específica, não conferir sabor, cor e odor estranhos ao vinagre, não conter metais ou qualquer outra substância que possa ser extraída ou atacada pelo ácido do vinagre, não ser passível de compactação (pois há necessidade de passagem contínua de líquido de cima para baixo e ar no sentido inverso) e ter certa durabilidade e disponibilidade (AQUARONE *et al*, 1983).

Os materiais de enchimento mais utilizados nesses geradores são bagaço de cana, sabugo de milho, tiras de madeira, cortiça em pedaços, bagaço de uvas, carvão vegetal,

cerâmica em pedaços, vime, junco, plástico, isopor, etc. (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979)

A injeção de ar no gerador não apresenta vantagens já que, sendo a reação de oxidação do álcool a ácido acético exotérmica, forma-se um gradiente de temperatura e o ar é naturalmente aspirado para dentro do gerador (AQUARONE *et al*, 1983).

2.3.3 Processos submersos

O desenvolvimento da indústria vinagreira foi muito lento devido ao baixo valor do produto e ao caráter artesanal das fábricas. Somente no século XX, em 1932, um alemão chamado Frings patenteou um modelo de acetificador provido de dispositivos para controle da temperatura, de aeração forçada e para renovação semicontínua da carga de vinho-vinagre. Mais tarde, esse equipamento sofreu alterações e tornou-se conhecido como acetificador Frings, substituindo com frequência os geradores de recheio (LLAGUNO & POLO, 1991).

Este tipo de acetificador utiliza o processo submerso, onde a produção de ácido acético é realizada pela presença dos microrganismos submersos no líquido a ser acetificado, saturado constantemente por microbolhas de ar. A obtenção de vinagres por este método pode se dar com alta eficiência (AQUARONE *et al*, 1983).

A diferença deste método para o processo alemão é o fato da cultura de microrganismos estar submersa sem a presença de nenhum suporte (material poroso). Neste processo, as bactérias acéticas encontram-se submersas no líquido a fermentar, onde se multiplicam, retirando energia da reação de oxidação do álcool etílico a ácido acético. Entretanto, para catalisar esta reação que lhes fornece energia, as bactérias acéticas necessitam da administração contínua, íntima e adequada de oxigênio em todos os pontos do tanque, pois pequenas interrupções no fornecimento de oxigênio, ainda que por alguns minutos, principalmente nas fases finais de fermentação, podem afetar muito o rendimento (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979).

O equipamento mais utilizado para a produção de vinagre em cultura submersa é conhecido pelo nome de acetificador de Frings, fabricado e patenteado pela Heinrich Frings-Bonn, Alemanha (Figura 2.3) (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979).

Esses aparelhos são automatizados, de fácil manuseio e funcionamento. Por meio do processo submerso pode-se fabricar tanto vinagre de vinho como de álcool, com concentrações iniciais de álcool de 4 a 13% em volume e obter-se vinagre com concentrações

até 10% e com rendimentos superiores a 90% (até 94% (LLAGUNO & POLO, 1991)). A produção de vinagre é mais rápida e o produto obtido mais uniforme (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979).

Outra vantagem oferecida pelo método é o menor espaço ocupado pelo acetificador.

Diversos outros equipamentos podem ser encontrados para a fabricação industrial de vinagres tais como o *Acetomatic* (Genebra), *Vinegator* (Suíça), *Cavitator* (USA) entre outros, os quais utilizam processos de fermentação semelhantes aos descritos, com pequenas variações de funcionamento (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979).

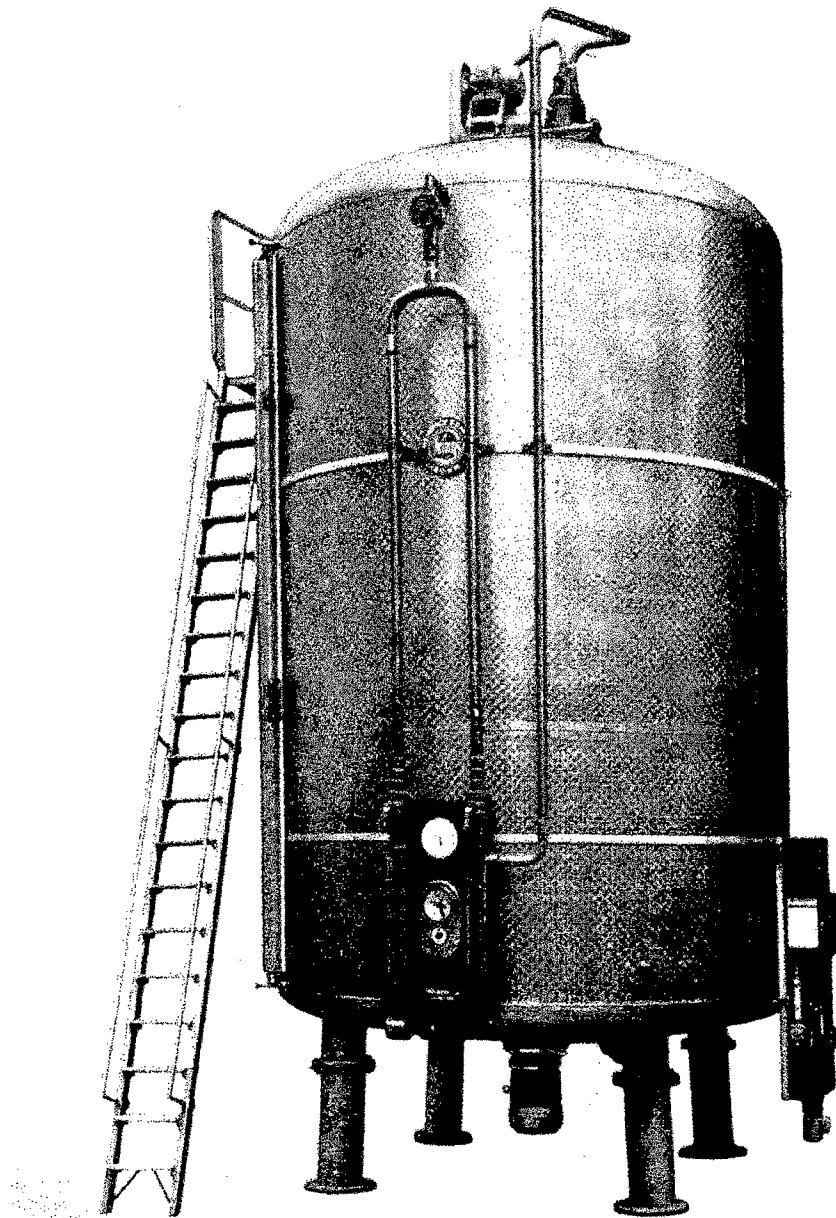


Figura 2.3 – Acetificador Frings em aço inoxidável (MECCA, 1979)

2.3.4 Processamento final do vinagre

Após a fermentação, o vinagre deve passar por etapas que o tornem limpo e estabilizado. Isto inclui processos de clarificação, filtração, envelhecimento, estabilização e envase.

A clarificação pode ser feita por diversos processos: espontânea ou autoclarificação, mecânica ou centrifugação e físico-química, através de substâncias orgânicas e inorgânicas usadas como clarificantes (gelatinas, caseína, albumina, bentonita entre outras) (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979).

A operação de filtração tem como finalidade a separação definitiva de impurezas do vinagre. Dependendo do diâmetro das partículas que vão ser retidas, o processo de filtração pode chegar a ser esterilizante (retém partículas com diâmetro inferior a 1 micra – ultrafiltração) (LLAGUNO & POLO, 1991).

Para o vinagre obtido por processo lento que fornece praticamente vinagre límpido devido ao tempo que permanece em repouso durante o período de acetificação, apenas uma filtração é suficiente para que o produto se apresente límpido. A seguir, ajusta-se a concentração com água potável, pasteuriza-se a 65°C por 5 minutos e envasa-se a quente (AQUARONE *et al*, 1983).

No Brasil, o processo de envelhecimento não é normalmente praticado. Esta etapa consiste em submeter o produto após a acetificação, clarificação e filtração a um período de maturação, ao final do qual o vinagre apresenta características organolépticas diferenciadas (LLAGUNO & POLO, 1991). Segundo MECCA *et al* (1979), durante o envelhecimento há diminuição da acidez fixa, transformações dos taninos e corantes e formação do "bouquet" do vinagre.

A etapa de estabilização do vinagre permite manter suas características físico-químicas e organolépticas durante o período de comercialização. Pode ser feita por métodos físicos ou químicos.

Os métodos físicos mais usados na indústria vinagreira são a pasteurização e a ultrafiltração (LLAGUNO & POLO, 1991; MECCA *et al*, 1979). A pasteurização destrói as bactérias e inativa as enzimas responsáveis por alterações posteriores. A temperatura do tratamento térmico pode variar entre 50 e 85°C, em função do tempo de tratamento (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979).

Os métodos químicos consistem na adição de substâncias que auxiliam na estabilização do vinagre. A legislação espanhola permite somente a adição de dióxido de

enxofre numa dose máxima de 250 mg/L, expresso como dióxido de enxofre total e ácido cítrico como antioxidante numa concentração máxima de 1 g/L (LLAGUNO & POLO, 1991).

A legislação brasileira também prevê como forma de estabilização do vinagre a pasteurização ou o uso de dióxido de enxofre (ANEXO II), num teor máximo de 0,02 g por 100 mL de vinagre de vinho.

O processo por geradores que utilizam material de enchimento também fornece produto quase límpido já que parte das substâncias que poderiam turvar o vinagre é retirada no material suporte do gerador. A filtração é feita em filtro-prensa seguindo-se a pasteurização e o acondicionamento (AQUARONE *et al*, 1983).

O processo submerso fornece vinagre bruto bastante turvo por conter em suspensão as bactérias acéticas e as substâncias sólidas originadas da matéria-prima. Este vinagre necessita de uma clarificação, filtração, diluição, pasteurização antes de seu envase (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979).

2.4 BACTÉRIAS ACÉTICAS

Ao contrário da fermentação alcoólica, tem-se verificado que o emprego de culturas puras fornece um produto inferior ao obtido com culturas naturais, e portanto mistas, pois as espécies estão provavelmente em simbiose (AQUARONE *et al*, 1983).

Assim, após o término da fermentação alcoólica, inocula-se o vinho com essa mistura de bactérias úteis e ativas adicionando "vinagre forte", que é o vinagre não diluído e não pasteurizado de uma fermentação anterior, contendo altas concentrações de bactérias acéticas ativas (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979, LLAGUNO, 1971).

Embora mais de 100 espécies, subespécies e variedades do gênero *Acetobacter* tenham sido classificadas através dos anos, poucas são aquelas com qualidades industriais, isto é, produzir concentrações elevadas de ácido acético, não formar material viscoso, ter tolerância a concentrações razoáveis de etanol e ácido acético, desenvolver-se em temperaturas entre 25 e 30°C e preferencialmente, não oxidar os compostos completamente até gás carbônico e água.

Autores modernos citam como de interesse industrial as *Acetobacter aceti*, *A. xylinoides*, *A. orleanense* ou *pasteurianus*, *A. acetigenum*, *A. schuetzenbanchii*, *A. curvum* e *A. rances* (AQUARONE *et al*, 1983).

As bactérias acéticas são gram-negativas, quando jovens apresentam a forma de bastonetes, podem ser móveis, ocorrem isoladas, aos pares ou em cadeias e são aeróbias estritas, isto é, o oxigênio é o aceptor final dos elétrons (AQUARONE *et al*, 1983; CARBONELL, 1970). Formam película ou crosta na superfície da cultura, vulgarmente chamadas de “mãe do vinagre”, de onde partem os repiques. Essas películas variam de acordo com a espécie, podendo ser delgadas, espessas, contínuas ou em ilhas (AQUARONE *et al*, 1983).

Descrições clássicas desses microrganismos informam que *A. aceti* suporta 11% de álcool e produz 6,5% de ácido acético; sua temperatura ótima de crescimento é de 34°C entre os extremos de 5 e 42°C; *A. orleanense* tem um ótimo entre 20 e 25°C, e os extremos são de 15 e 30°C (AQUARONE *et al*, 1983).

2.4.1 Metabolismo das bactérias acéticas

Os aspectos bioquímicos das bactérias acéticas não têm sido extensamente estudados, como por exemplo, os das leveduras ou das bactérias lácticas.

Um dos principais aspectos na produção de vinagres é a transformação de etanol em ácido acético. As bactérias acéticas oxidam o etanol em duas etapas. Na primeira etapa, o etanol é oxidado a acetaldeído e na segunda, o acetaldeído é oxidado a ácido acético (LLAGUNO & POLO, 1991).

O esquema da oxidação do etanol pelas bactérias *Acetobacter* proposto por Nakayama confirma esta hipótese (LLAGUNO & POLO, 1991).

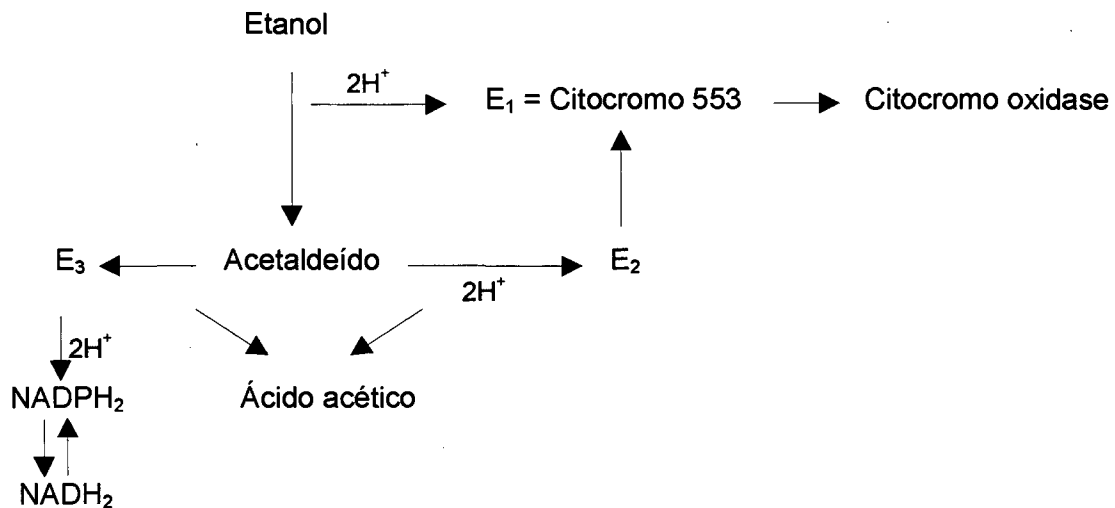


Figura 2.4 – Esquema da oxidação do etanol pelo *Acetobacter*, proposto por Nakayama (LLAGUNO & POLO, 1991)

O etanol é oxidado a acetaldeído pelo E₁ e os elétrons resultantes são aceitos pelo grupo hemo-ferro do citocromo 553 da enzima. O acetaldeído assim formado, continua oxidando-se via E₂ ou E₃. Pela primeira via, os elétrons liberados do acetaldeído se transferem ao grupo hemo unido a E₁, isto é, ao citocromo 553, e pela segunda via, reduzem o NADP. O NADH₂ produzido por E₃ evita que a oxidação do ácido acético continue através do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. O pH ótimo (ácido, próximo a 4,0) de E₁ e E₂ também favorece o acúmulo de ácido acético pelas espécies de *Acetobacter* (LLAGUNO & POLO, 1991).

A oxidação do etanol é uma característica das bactérias acéticas mas diversos outros carboidratos e álcoois primários e secundários podem servir de fontes de energia para esses microrganismos.

Os açúcares são oxidados a CO₂ exclusivamente através da via das pentoses-fosfato; a rota de Entner-Doudoroff comum nos aeróbios quimioheterótrofos, não se realiza neste grupo. Também é incomum nestas bactérias o metabolismo do ácido pirúvico, já que as mesmas o descarboxilam não oxidativamente a acetaldeído, ao contrário da maioria dos microrganismos aeróbios que o oxidam a acetil-CoA e CO₂ (LLAGUNO & POLO, 1991).

A Figura 2.5 apresenta as principais vias metabólicas nas bactérias acéticas.

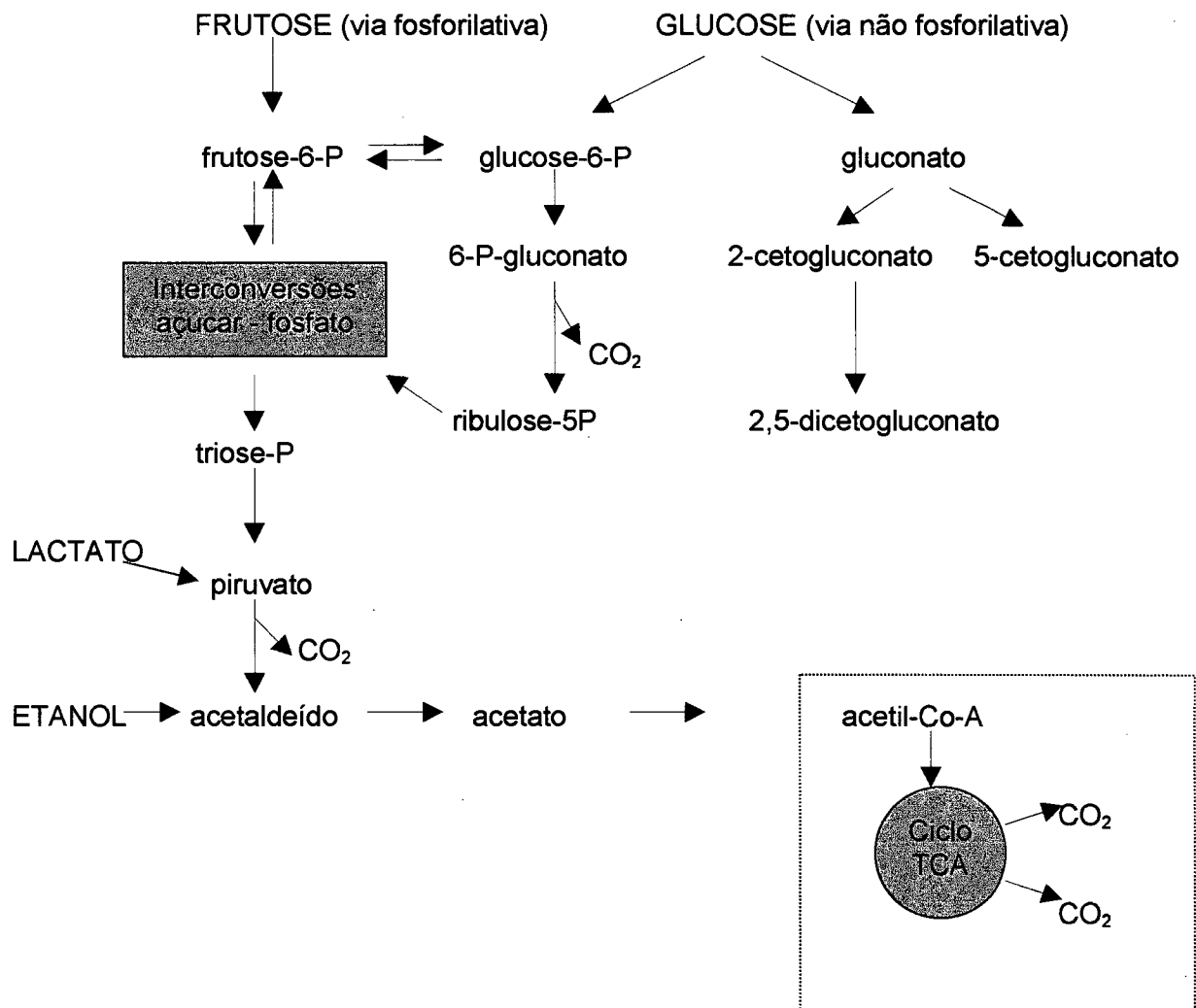


Figura 2.5 – Principais vias metabólicas do metabolismo oxidativo nas bactérias acéticas (LLAGUNO & POLO, 1991)

2.5 COMPOSIÇÃO DO VINAGRE

A composição do vinagre de vinho é tão complexa quanto a da matéria-prima utilizada para a sua fabricação. Grösseiramente pode-se dizer que a composição dos vinagres de vinho é a mesma da matéria-prima antes da fermentação acética, exceto pela transformação do álcool etílico em ácido acético (CARBONELL, 1970). Dessa forma, pode se dizer que a composição básica dos vinagres de vinho é dada pela água, seu maior componente; o ácido acético, proveniente do álcool etílico; álcool metílico; álcoois superiores; glicerina; ácidos procedentes da uva (tânico, tartárico, málico e cítrico); os ácidos procedentes da fermentação

alcoólica (succínico e láctico); antocianinas; materiais pécnicos e nitrogenados; substâncias minerais e aldeídos e estéres formados pelas reações de oxiredução e esterificação durante as fermentações (CARBONELL, 1970).

Na realidade, essa composição é um tanto quanto mais complexa, já que o vinagre de vinho é um produto resultante de dois processos fermentativos, o que envolve diversas reações e transformações bioquímicas dos compostos, primeiramente do mosto e posteriormente, do vinho. Essas reações, principalmente de esterificação formam os compostos que conferem ao produto final sabores e aromas característicos, agradáveis e inconfundíveis.

A Tabela 2.2 apresenta a composição química dos vinagres de vinho segundo MECCA *et al*, (1979).

Composto	Limites
álcool etílico (% V/V)	0,1 – 1,5
acidez volátil expressa em ácido acético (g/100 mL de produto)	5 – 7
extrato seco (g/L)	10 – 25
cinzas (g/L)	1,3 – 3,5
tartarato de potássio (g/L)	1,0 – 1,3
glicerina (g/L)	2 – 6
butilenoglicol g/L)	0,5 – 1,5
etanal (mg/L)	30 – 400
acetato de metila (mg/L)	5 – 50
dimetilcetona (mg/L)	traços – 15
acetato de etila (mg/L)	40 – 1500
metil-propanol-2 (mg/L)	traços – 2
metanol (mg/L)	60 – 130
butanol-2 (mg/L)	traços – 2
propanol-1 (mg/L)	2 – 22
acetato de isoamila (mg/L)	traços – 5
metil-propanol-1 (mg/L)	5 – 40
pentanol- 1 e 2; butanol-1 (mg/L)	ausentes
2 e 3 metilbutanol-2 (mg/L)	40 – 85
acetoína (acetilmetilcarbinol) (mg/L)	80 – 800
ferro (mg/L)	4 – 10
cobre (mg/L)	0,3 – 0,8
cálcio (mg/L)	50 – 180

zinco (mg/L)	2 – 4
chumbo (mg/L)	0,1 – 0,125
tirosina (mg/L)	3 – 10
fenilalanina (mg/L)	10 – 20
lisina (mg/L)	40 – 50
histidina (mg/L)	4 – 10
arginina (mg/L)	20 – 30
ácido aspártico (mg/L)	10 – 20
ácido glutâmico (mg/L)	15 – 20
treonina (mg/L)	10 – 15
serina (mg/L)	5 – 10
prolina (mg/L)	150 – 250
alanina (mg/L)	50 – 70
glicina (mg/L)	20 – 25
valina (mg/L)	15 – 25
metionina (mg/L)	5 – 10
isoleucina (mg/L)	10 – 15
leucina (mg/L)	15 – 25

Tabela 2.2 – Composição química do vinagre de vinho (MECCA et al, 1979)

2.5.1 Ácido acético

O ácido acético ($H_3C - COOH$), peso molecular 60,05616 e densidade 1,049 g/mL, é o principal componente dos vinagres quaisquer que sejam o substrato alcoólico precedente e sua concentração é expressa em graus acéticos (gramas de ácido acético por 100 ml de vinagre) (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979; CARBONELL, 1970).

A acetificação, isto é, a transformação do etanol em ácido acético por ação de bactérias acéticas não é capaz de fornecer altas concentrações deste ácido já que o mesmo inibe o crescimento das bactérias. Atualmente consegue-se obter concentrações até 12 graus acéticos utilizando-se bactérias selecionadas, com resistência ao ácido acético (LLAGUNO & POLO, 1991).

Para uso como alimento, o vinagre deve ter no máximo 5 – 6º acéticos (LLAGUNO & POLO, 1991). No Brasil, a legislação prevê um teor de 4º acéticos para os vinagres comerciais.

2.5.2 Álcool etílico (etanol) residual

Na fabricação industrial de vinagre objetiva-se alcançar o maior rendimento possível na transformação de etanol a ácido acético. Porém não se deve chegar ao esgotamento desse substrato pois as bactérias acéticas, na ausência de álcool etílico, são capazes de promoverem a degradação do ácido acético produzido, o que torna o processo antieconômico (LLAGUNO & POLO, 1991; AQUARONE *et al*, 1983; MECCA *et al*, 1979).

Os processos industriais modernos são bastante eficientes e produzem vinagres com pequenas concentrações de etanol, o que não acontece em processos artesanais onde não é possível nem desejável a total utilização do álcool etílico do vinho para que, durante o envelhecimento do vinagre, o teor residual de etanol (2 a 3º alcoólicos) produza ésteres quando da combinação com o ácido acético (LLAGUNO & POLO, 1991).

No Brasil, a legislação estabelece um teor máximo de 1º G.L. de álcool residual para os vinagres (BRASIL, 1990).

2.5.3 Extrato seco

O teor de extrato seco do vinagre de vinho é composto por substâncias não voláteis presentes no produto, tais como glicerina, substâncias pécticas, substâncias nitrogenadas, entre outras.

A determinação do extrato seco de vinagres é uma tentativa de evitar fraudes bastante utilizada no passado, já que teores muito baixos ou muito altos de extrato seco podem indicar adulterações do produto. Produtos diluídos com água ou com soluções de ácido acético apresentam teores baixos de extrato seco, assim como teores muito altos de extrato seco podem indicar uma adição de substâncias não voláteis que aumentam o resíduo seco (LLAGUNO & POLO, 1991).

Mecca afirma serem normais os valores entre 10 e 25 g/L de extrato seco para vinagres de vinho (MECCA, 1979). A legislação espanhola estabelece um valor mínimo de 1,55 g/L/grau acético e um valor máximo de 3,2 g/L/grau acético para o teor de extrato seco de vinagres de vinho (LLAGUNO & POLO, 1991). No Brasil, a legislação estabelece um valor mínimo de 7 g/L para vinagres de vinho tinto e 6 g/L para vinagres de vinho branco (BRASIL, 1990).

2.5.4 Cinzas

A determinação do teor de cinzas objetiva determinar os minerais contidos no produto. As considerações para o teor de cinzas são análogas para o teor de extrato seco dos vinagres. Um vinagre diluído e reconstituído parcialmente com ácido acético apresenta baixos valores para o teor de cinzas assim como valores muito altos podem indicar a adição de substâncias não voláteis.

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

2.5.5 Acetoína

A acetoína ou acetilmetilcarbinol ($C_4H_8O_2$) é uma cetona (3-hidroxi-2-butanona) de odor agradável, peso molecular 88,10 e ponto de ebulição 148°C. É um produto comumente formado em fermentações por atividade microbiana de bactérias lácticas e leveduras (TEIXEIRA, 1999; MORITZ, D. E., 1998; LEWIS *et al*, 1997; PALACIOS *et al*, 1995; ROMANO & SUZZI, 1996; ROMANO *et al*, 1995, 1994; de REVEL, 1992; TRONCOSO & GUZMÁN, 1987).

A acetoína faz parte do aroma de bebidas alcoólicas fermentadas e em alguns casos, transforma-se em um problema quando é oxidada a diacetil. O diacetil apresenta odor característico que causa um decréscimo no *flavor* dessas bebidas sendo percebido em vinhos a níveis muito baixos (valor de *threshold* de 8 mg/L) (ROMANO & SUZZI, 1996).

Nos vinagres também se detecta a presença de acetoína já que durante a fermentação acética há uma produção dessa substância (TRONCOSO & GUZMÁN, 1987). Segundo GERBI *et al* (1995), em seu estudo da evolução de alguns componentes do vinho durante a acetificação, há um considerável aumento da acetoína, chegando a se obter um aumento de cerca de 700% no vinagre.

2.5.5.1 Biossíntese de acetoína em leveduras

Até as publicações de Collins (1972) e Wainwright (1973) (em ROMANO & SUZZI, 1996), que descobriram a biossíntese de acetoína em leveduras, o mecanismo da produção de compostos acetoínicos era uma grande controvérsia, já que alguns autores atribuíam a

produção de acetoína somente às bactérias e pouco se sabia sobre as reações bioquímicas dessa produção.

A Figura 2.6 mostra um resumo das reações conhecidas atualmente.

Em leveduras produtoras de vinho, a acetoína é um subproduto significativo do metabolismo de carboidratos, o qual ocorre somente na presença de carboidrato fermentescível ou de ácido pirúvico (ROMANO & SUZZI, 1996). As leveduras formam piruvato a partir da glicose pelo processo de glicólise e uma reação chave na utilização do piruvato é sua descarboxilação à hidroxietiltiamina PP_i , chamado de complexo acetaldeído-TPP ou acetaldeído ativo. Dependendo do substrato com o qual o acetaldeído ativo reage, as seguintes seqüências podem ser derivadas:

Rota A: *acetaldeído TPP + piruvato* → *acetolactato* → *acetoína*

Rota B: *acetaldeído TPP + acetil coenzima A* → *diacetil* → *acetoína*

Rota C: *acetaldeído TPP + acetaldeído* → *acetoína*

2.5.5.2 Biossíntese de acetoína em bactérias acéticas

Um dos primeiros estudiosos a estudar a formação de acetoína pelas bactérias acéticas foi Kitasato em 1929, usando o piruvato como substrato (LLAGUNO & POLO, 1991).

A presença da enzima piruvato descarboxilase foi confirmada por ensaios com células intactas realizadas por Asai, em 1968. A piruvato descarboxilase e as enzimas participantes da formação da acetoína estão presentes mais ativamente na fração solúvel dos extratos livres das células (LLAGUNO & POLO, 1991; SHIMAZU *et al*, 1985).

O pirofosfato de tiamina (TPP) favorece a produção de CO_2 e a síntese de acetoína a partir do piruvato. Quando se adiciona acetaldeído ao piruvato em condições anaeróbias em extratos livres de células, se aumenta a formação de acetoína mas não a produção de CO_2 , o que apoia a teoria de que a acetoína se forma por reação entre o acetaldeído e o aldeído TPP (LLAGUNO & POLO, 1991; SHIMAZU *et al*, 1985).

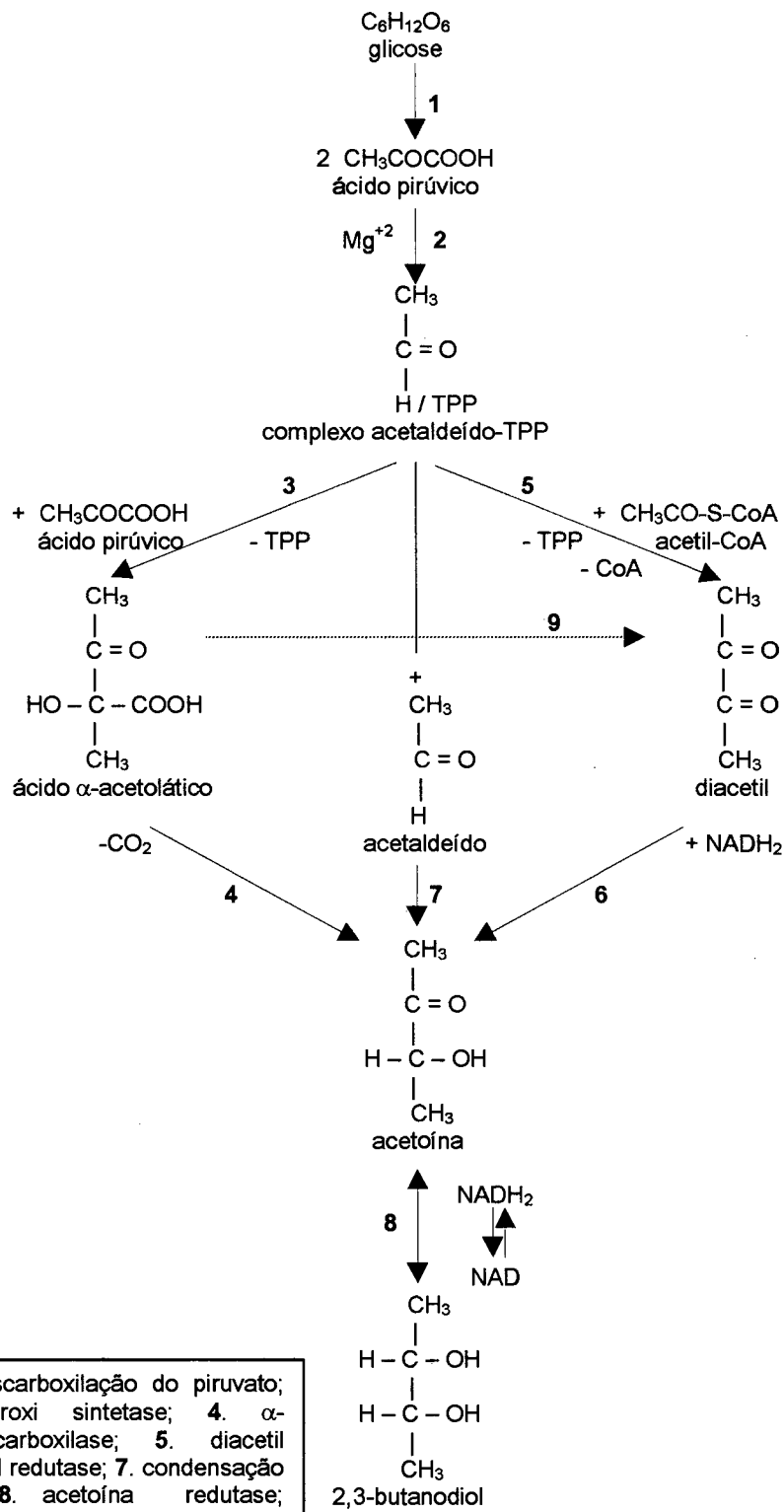
A acetoína também se forma a partir do acetolactato acompanhada de descarboxilação, quando se utilizam extratos livres de células. Isto apoia a hipótese da

existência de outra via metabólica que inclui uma enzima α -acetolactato descarboxilase ativa (LLAGUNO & POLO, 1991).

Na maioria das bactérias, a acetoína é formada a partir do piruvato e é portanto, um produto do metabolismo de carboidratos. Em geral, pouca ou nenhuma acetoína é produzida a partir de carboidratos sem a presença de uma fonte adicional de piruvato. Uma fonte comum é o citrato. O citrato é transportado para dentro da célula por uma permease induzível e é quebrado em acetato e oxaloacetato, que é então descarboxilado a piruvato. Duas moléculas de piruvato condensam-se formando o α -acetolactato, que é descarboxilado formando acetoína, posteriormente convertida em butanodiol (CARVALHO, 1999; de REVEL, 1992).

A taxa de entrada do citrato nas células não é regulada pelo metabolismo – há uma relação linear entre a taxa de consumo de citrato no meio e a quantidade de biomassa – e a produção de acetoína funcionaria como um mecanismo de detoxificação, removendo o piruvato desnecessário para a síntese de material celular na forma de uma molécula neutra (CARVALHO, 1999; de REVEL, 1992).

A Figura 2.7 mostra a síntese de acetoína pelas bactérias a partir da degradação do ácido cítrico.



1. glicólise; 2. descarboxilação do piruvato; 3. ácido-acetohidroxi sintetase; 4. α -acetolactato descarboxilase; 5. diacetil sintetase; 6. diacetil redutase; 7. condensação do acetaldeído; 8. acetoína redutase; 9. descarboxilação oxidativa.

Figura 2.6 – Esquema da biossíntese de acetoína em leveduras (ROMANO & SUZZI, 1996)

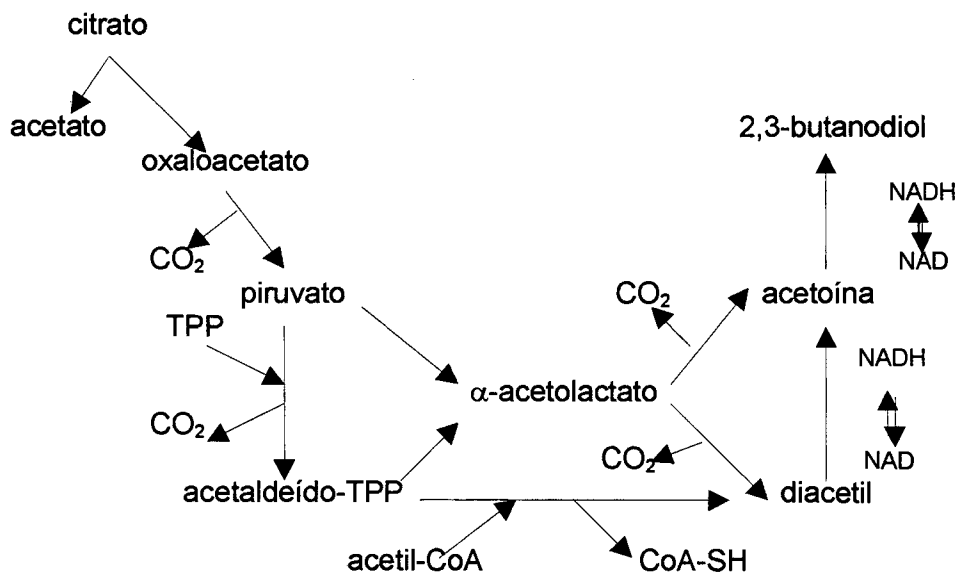


Figura 2.7 – Síntese de acetoina por bactérias (CARVALHO, 1999; de REVEL, 1992)

2.5.5.3 Fatores que afetam a produção de acetoina

Diversas variáveis podem afetar a produção de acetoina, principalmente os fatores diretamente ligados ao metabolismo dos microrganismos (ROMANO & SUZZI, 1996; GERBI et al, 1995). O aumento da temperatura de fermentação favorece a taxa de decomposição do α -acetolactato, e portanto, mais diacetil e acetoina são produzidos. Fermentações a 30°C, em comparação com fermentações a temperatura de 24°C, produzem maiores quantidades de acetoina (ROMANO & SUZZI, 1996).

A aeração também representa um importante papel na formação de acetoina. Em altos níveis de aeração, grandes quantidades de acetoina são produzidas por ação microbiana (ROMANO & SUZZI, 1996).

Segundo TEIXEIRA, citando BASSIT *et al*, 1993, concentrações máximas de diacetil e acetoina produzidos por *Lactococcus lactis* são encontrados em meios com 100% de saturação em O₂, pois a presença de oxigênio intensifica a atividade da α -acetolactato sintetase.

Estudos sobre a formação de acetoina em meios sintéticos sem e com álcool mostram que a produção de acetoina em presença de etanol é aumentada pela adição de piruvato e lactato. Também as adições de substâncias como glicerina, succinato, malato, fumarato e

oxaloacetato aumentam a formação de acetoína. A adição de acetato, acetaldeído, gluconato e α -cetogluturato não aumentam a produção de acetoína (LLAGUNO & POLO, 1991).

A formação de acetoína depende também das cepas de microrganismos que são utilizados na fermentação mas depende muito mais da quantidade de células viáveis presentes no processo (ROMANO & SUZZI, 1996).

A conversão de α -acetolactato a diacetil ocorre de forma não enzimática, fora das células e é dependente do pH. Baixos valores de pH resultam em uma degradação mais rápida da α -acetolactato a diacetil. Porém, de forma contrária, a enzima diacetil redutase, que converte o diacetil a acetoína, não é muito ativa a pH baixos (ROMANO & SUZZI, 1996). Segundo SHIMAZU *et al* (1985), o pH ótimo para a produção de acetoína a partir de ácido pirúvico por extrato livre de células de *Leuconostoc mesenteroides*, em seus experimentos foi 6,0, não sendo formada nenhuma acetoína em sistemas com pH abaixo de 5,0 ou acima de 8,0.

Quando comparadas as condições de fermentação, o teor de oxigênio e a concentração de células viáveis exercem maior influência sobre a taxa de formação de acetoína do que o tipo de cepas dos microrganismos e a temperatura de fermentação (ROMANO & SUZZI, 1996).

2.5.5.4 Concentração de acetoína em vinhos

A acetoína é um produto normal da fermentação alcoólica e seu conteúdo em vinhos pode ser originário de diferentes fontes: leveduras durante a fermentação alcoólica, leveduras esporuladas, bactérias durante a fermentação malolática e bactérias esporuladas (ROMANO & SUZZI, 1996). As quantidades de acetoína podem variar no vinho, geralmente vão de 10 até 80 mg/L (ROMANO & SUZZI, 1996; PALACIOS *et al*, 1995), mas diferentes valores podem ser encontrados. Os valores mais comumente encontrados encontram-se abaixo de 30 mg/L (SHINOHARA *et al*, 1979). Em geral, os vinhos tintos apresentam teores de acetoína maiores do que os vinhos brancos (ROMANO & SUZZI, 1996). A tabela a seguir mostra alguns valores pesquisados.

País	Tipo de vinho	Concentração de acetoína (mg/L)		Autor
		Faixa	Média	
Itália	tinto de mesa	3 – 28	6,6	Gobis e Farfaletti-Casali
	branco de mesa	0,1 – 19,9		Pallotta <i>et al</i>
	tinto de mesa	0,1 – 24,0	19,2	Pallotta <i>et al</i>
França	diversos	2 – 84	10	Ribéreau-Gayon <i>et al</i>
	branco de mesa	4,5 – 12	7	Peynaud
		16 – 129		Baumes <i>et al</i>
	tinto de mesa	6 – 18	11	Peynaud
		55 – 261		Baumes <i>et al</i>
Alemanha	diversos	0 – 29	7,8	Amerine
	branco de mesa	1,9 – 31,7	5,9	Postei e Guvene
	tinto de mesa	5,9 – 38,2	15	Postei e Guvene
Rússia	de mesa	8 - 36, 2	15,1	Kavadze <i>et al</i>
Japão	de mesa	8 – 36,2	16 – 53	Shinohara
Austrália	branco de mesa	0,7 – 4,3	1,8	Fornachon e Lloyd
	tinto de mesa	1,5 – 44	10,6	Fornachon e Lloyd
Estados Unidos	branco de mesa	17,4 – 20,4	18,3	Guymon e Crowell
	tinto de mesa	18,8 – 20,3	19,6	Guymon e Crowell

Tabela 2.3 – Concentrações de acetoína em vinhos de diferentes países (ROMANO & SUZZI, 1996)

2.5.5.5 Teores de acetoína em vinagres

Pode-se dizer que a quantidade de acetoína presente nos vinagres está geralmente associada à qualidade dos vinagres porque é um composto tipicamente produzido durante o processo de acetificação (GERBI *et al*, 1995; TRONCOSO GONZÁLES & GUZMÁN CHOZAS, 1987). Este fato tem sido bastante utilizado para diferenciar vinagres de origem fermentativa dos vinagres artificiais, já que nenhuma acetoína é encontrada neste último tipo de produto.

É interessante ressaltar que o tipo de processo fermentativo utilizado também influencia nos teores finais de acetoína nos vinagres já que no processo de fermentação submerso quantidades menores de acetoína são formadas, enquanto valores bem maiores são encontrados quando outros processos são utilizados (TRONCOSO GONZÁLES & GUZMÁN CHOZAS, 1987). Llaguno cita como valores até 400 mg/L de acetoína para acetificadores de

recheio e valores próximo a 100 mg/L para processos submersos e afirma ainda, que há casos em que chega a se obter vinagres com 1g/L de acetoína (LLAGUNO & POLO, 1991).

Já em 1979, MECCA *et al* (1979) afirmavam que os vinagres de vinho apresentam valores entre 80 a 800 mg/L de acetoína, sendo esta concentração uma indicação da integridade química e / ou da alteração do produto.

Em um estudo realizado com vinagres italianos, GERBI *et al* (1995) utilizando um acetificador similar ao reator industrial Frings, encontraram valores de 276 mg/L de acetoína em seu produto final obtido a partir de vinho branco (20 mg/L de acetoína). Neste mesmo estudo, Gerbi afirma em suas conclusões que a determinação de concentrações de substâncias tais como acetoína, diacetil e acetato de etila é indicada para avaliar o grau de adulteração de vinagres pois a variação de suas concentrações no produto formado é muito elevada.

Em outro estudo sobre os vinagres espanhóis, TRONCOSO GONZÁLES & GUZMÁN CHOZAS (1987) encontraram um valor médio de 394 mg/L de acetoína nas amostras analisadas. Nenhuma das amostras mostrou uma concentração de acetoína abaixo de 200 mg/L. A maioria das amostras dos vinagres estudados apresentou resultados entre 200 a 500 mg/L.

A legislação espanhola para vinagres estabelece uma concentração mínima de 40 mg/L para seus produtos. A legislação italiana não estabelece limites para os teores de acetoína. A Comissão de Enologia da O.I.V. (Escritório Internacional da Vinha e do Vinho) tem também se interessado por este assunto e já apresentou para aprovação final em sua Assembléia Geral realizada em junho/2000, em Paris, uma metodologia para a determinação do teor de acetoína em vinagres de vinho (ANEXO III).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DE VINAGRES

3.1.1 Matérias-primas

3.1.1.1 Vinhos

Para a produção dos vinagres foram utilizados vinhos produzidos por microvinificações na Cantina Experimental da EPAGRI – Videira, a partir de uvas maduras e sãs das variedades Isabel e Villenave para vinhos tinto e branco, respectivamente.

O processamento seguiu as etapas comuns: desengace, esmagamento, sulfitagem do mosto, aplicação do pé de cuba, fermentação tumultuosa, fermentação lenta, trasfegas, filtração e engarrafamento.

3.1.1.2 Álcool

O álcool utilizado para o preparo das caldas a serem acetificadas foi o tipo comercial, 94°GL adquirido em supermercados locais.

3.1.2 Microrganismos

Para a fermentação acética não é comum o uso de culturas puras. Emprega-se geralmente uma microflora mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies ou variedades dessa bactéria, que é considerada a mais eficiente.

Os microrganismos utilizados para a acetificação dos vinhos e álcool foram obtidos a partir de vinagres fortes provenientes de processos da indústria de vinagres Castelo.

3.1.3 Fermentação acética

Para a fermentação acética das matérias-primas previamente citadas foram utilizados “fermentadores” construídos experimentalmente a partir de recipientes de vidro fechados, com volume de 5 litros, providos de tubos de vidro para a aeração forçada feita por um aparelho

borbulhador usado para aeração em aquários. O volume de ar usado variou entre 5 litros por hora por litro de calda a 8 litros de ar por hora por litro de calda.

A tampa do fermentador dispunha de orifícios tampados com algodão para permitir a saída de ar e retirada de amostras.

Os fermentadores foram mantidos em laboratório, a temperatura ambiente, durante todo o tempo do experimento.

3.1.3.1 Caldas

As caldas são as soluções para a posterior fermentação acética e foram preparadas da seguinte forma:

Para os vinagres de vinhos tinto e branco:

Para o início da fermentação acética, é necessário que as bactérias acéticas tenham um tempo de adaptação ao meio. Nesta fase, o meio a ser acetificado deve conter condições ideais para o crescimento desses microrganismos, ou seja, nutrientes essenciais, certo grau de acidez e substrato para seu desenvolvimento.

Os vinhos já apresentam em sua composição os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento das bactérias acéticas, não necessitando da adição de nenhum composto. Assim, para a etapa inicial da fermentação acética, uma solução de vinho e vinagre foi preparada a fim de se obter uma calda com cerca de 4°GL e acidez acética em torno de 6%.

Para a calda deste experimento, procedeu-se a diluição do vinho com vinagre de álcool comercial. A solução foi aquecida a 30°C e adicionada de vinagre forte (não pasteurizado e não diluído), contendo as bactérias acéticas. A mistura foi colocada no fermentador limpo e deixada para acetificar com aeração constante e baixa.

As Figuras 3.1 e 3.2 a seguir mostram os experimentos montados.

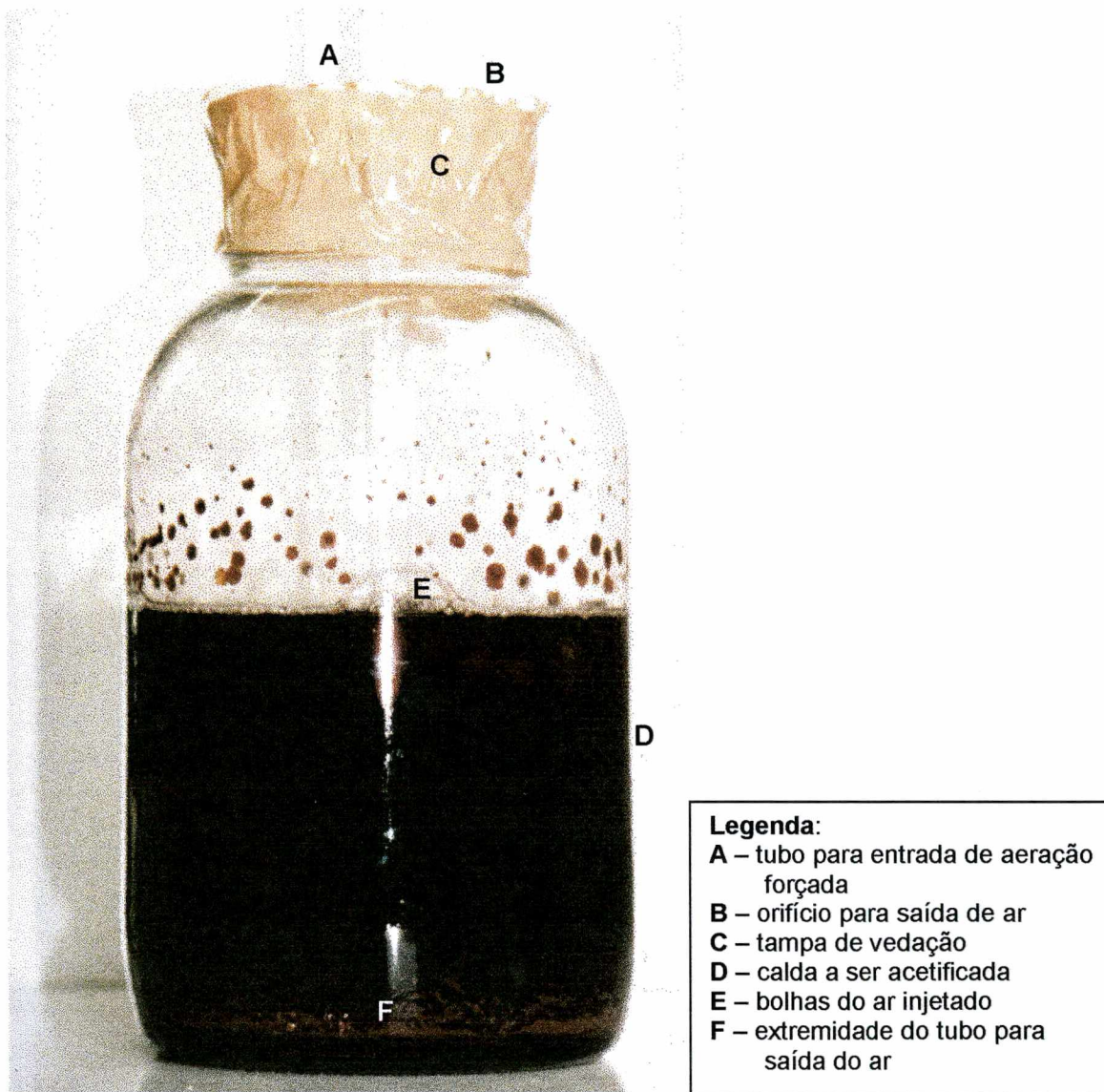


Figura 3.1 – Fermentador com vinho tinto no início da fermentação

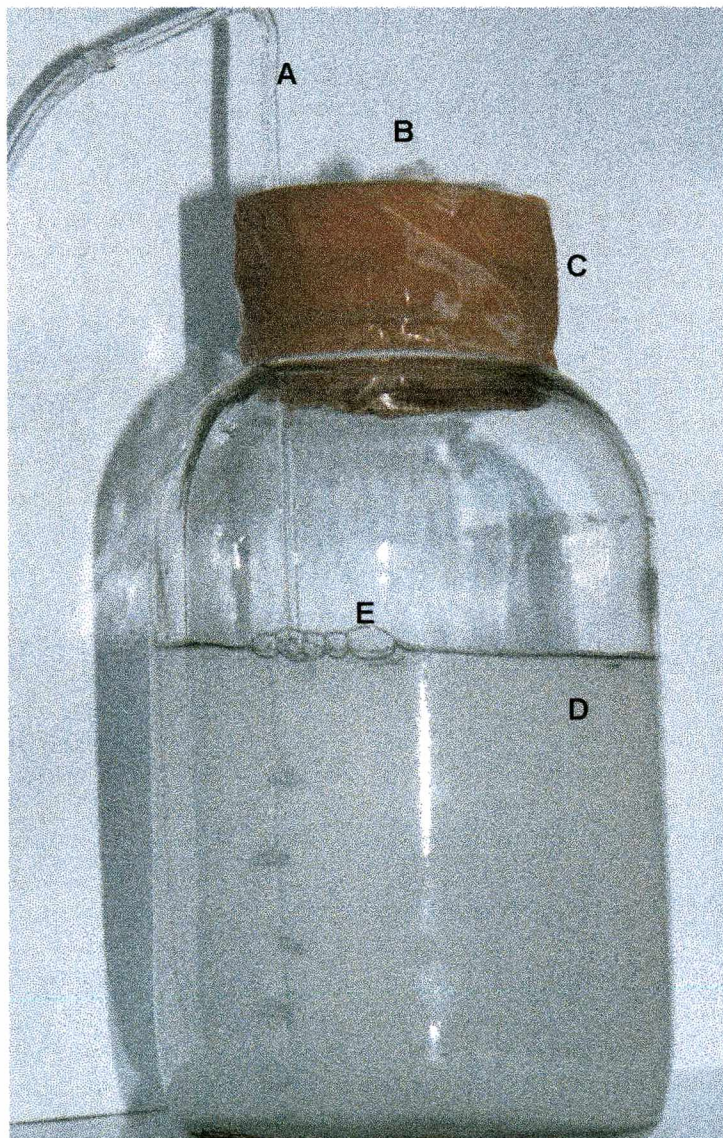
Para o vinagre de álcool:

A calda para o vinagre de álcool foi obtida da seguinte forma:

Água fervida e resfriada foi misturada com álcool para a obtenção de uma solução diluída com cerca de 4°GL. A solução foi aquecida a uma temperatura de 30°C para a adição do vinagre forte de álcool (não pasteurizado e não diluído), contendo as bactérias acéticas. A quantidade de vinagre forte a ser adicionada depende de seu teor de acidez e é determinada de forma a se obter uma calda com acidez acética final de 6%. Deve-se proceder também a adição de nutrientes essenciais para o crescimento dos microrganismos já que neste caso, a matéria-prima a ser fermentada apresenta deficiência desses nutrientes. Para o nosso caso,

utilizou-se uma mistura pré-preparada e usada comercialmente, o *Acetozyn*, que contém todos os nutrientes necessários para o crescimento das bactérias acéticas, na proporção de um grama para cada litro de calda a ser fermentada.

A mistura foi colocada no fermentador previamente limpo e deixada para fermentar, com aeração forçada e constante, obtida através de um aerador para aquários.

**Legenda:**

- A – tubo para entrada de aeração forçada
- B – orifício para saída de ar
- C – tampa de vedação
- D – calda a ser acetificada
- E – bolhas do ar injetado

Figura 3.2 – Fermentador com solução de álcool no início da fermentação

3.1.3.2 Remontagens

As remontagens são adições graduais de substrato para a manutenção dos microrganismos responsáveis pela fermentação acética até completar o volume desejado no fermentador.

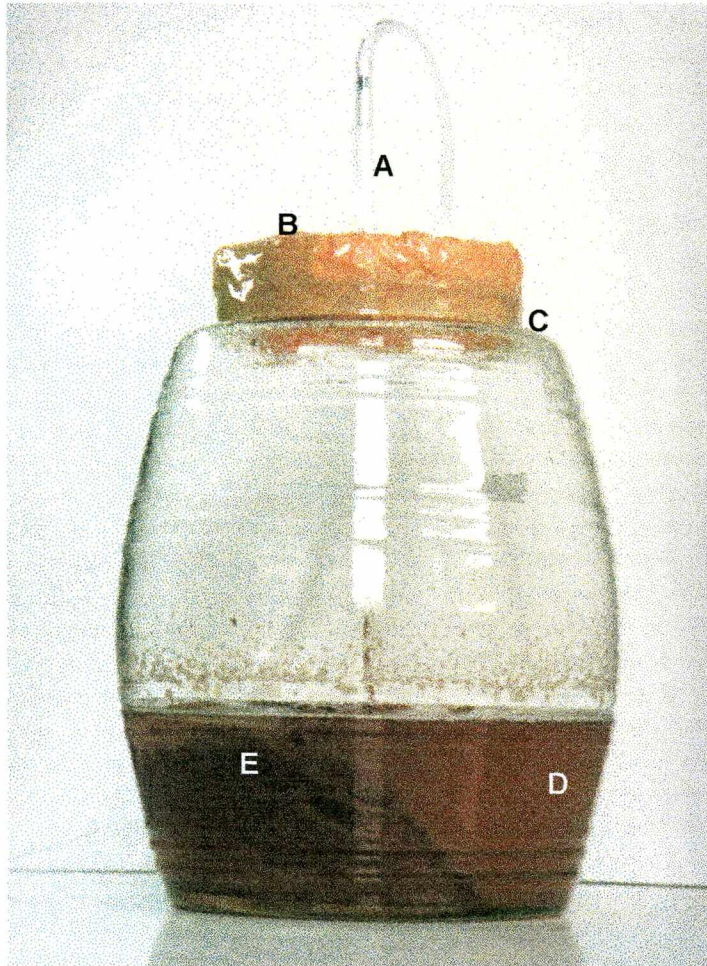
Assim, toda vez que o teor de substrato estiver baixo, deve-se adicionar mais vinho ou álcool. Industrialmente o controle é feito pela determinação do teor de álcool, mas por motivos de praticidade, para os nossos experimentos utilizou-se o teor de acidez total para se determinar a realização da remontagem.

Foram realizadas cinco remontagens para cada acetificação biológica, como o volume inicial foi de 2 litros de calda, a cada remontagem adicionou-se 250 mL de vinho ou álcool.

3.1.3.3 Manutenção da produção de vinagre e processamento final do vinagre

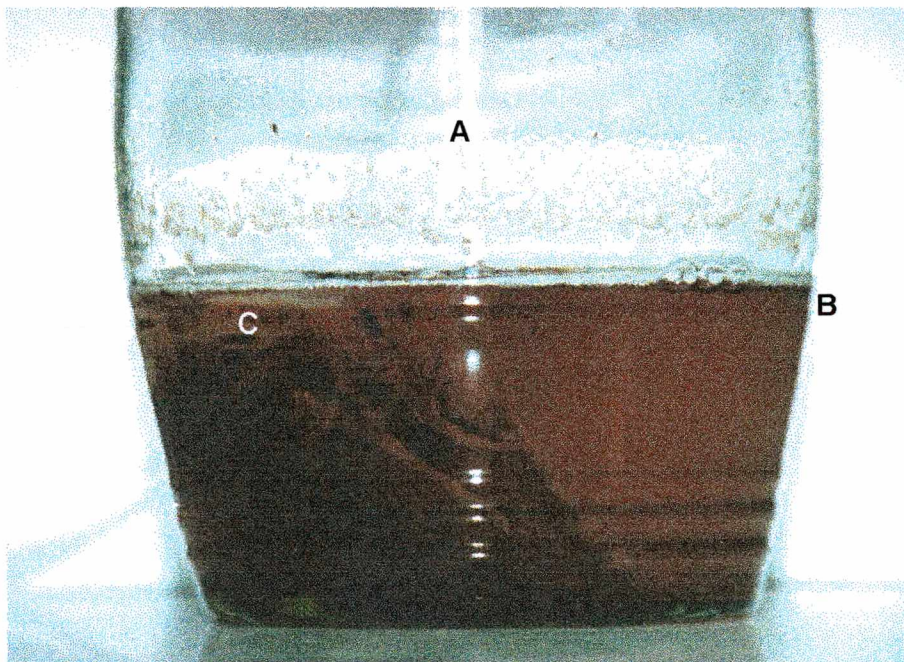
Após as remontagens, realizou-se as retiradas de amostras, adicionando-se igual quantidade de vinho ou álcool, toda vez que o teor alcoólico atingiu 1°G.L. ou o grau de acidez acética encontrava-se acima de 4,5 %. Nestes experimentos, a quantidade retirada foi de 600 mL de produto.

O vinagre assim obtido, foi filtrado em papel filtro, pasteurizado a 65°C por 5 minutos e envasado.



Legenda:
A – tubo para entrada de aeração forçada
B – orifício para saída de ar
C – tampa de vedação
D – calda em acetificação
E – mãe do vinagre

Figura 3.3 – Vinagre de vinho branco após remontagens



Legenda:
A – tubo para entrada de aeração forçada
B – calda em acetificação
C – mãe do vinagre

Figura 3.4 – Mãe do vinagre em formação

3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.1 Amostragem

Amostras foram retiradas dos fermentadores durante o processo de fermentação para avaliação do teor de acidez total e outras análises físico-químicas e cromatográficas para acompanhamento da acetificação.

Para a avaliação dos vinagres comerciais, as amostras foram compradas em supermercados. Foram adquiridas 17 amostras de vinagres de vinho tinto, 11 amostras de vinagres de vinho branco e 12 amostras de vinagres de álcool, sendo todas as amostras para cada tipo de vinagre, de marcas diferentes. As amostras encontravam-se em embalagens fechadas, em exposição nas gôndolas dos recintos comerciais.

3.2.2 Análises físico-químicas

Para as determinações físico-químicas da densidade, extrato seco, acidez volátil, cinzas e grau alcoólico utilizou-se os métodos oficiais de análises para vinagres conforme a Portaria N.º 076, de 27 de novembro de 1986, a seguir.

1. *Densidade a 20°C*

Material:

- densímetro graduado com escala de 980 a 1130 g/L
- proveta

Procedimento:

Lavar o densímetro com água destilada e depois com álcool; secar com papel de filtro e colocar no dessecador para eliminação da umidade. Encher a proveta com a amostra de modo que o densímetro fique abaixo do nível.

Acertar a temperatura para 20°C. Fazer a leitura direta no densímetro.

O resultado obtido é a densidade em g/L.

2. Extrato seco a 100°C

Material:

- cápsula cilíndrica de fundo chato de 70 mm de diâmetro e 20 mm de altura
- estufa
- banho-maria
- dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro
- balança analítica
- pinça
- pipeta volumétrica de 25 mL

Procedimento:

Pipetar 25 mL da amostra na cápsula, previamente seca na estufa a 110°C, resfriada no dessecador e tarada.

Evaporar lentamente em banho-maria a 100°C durante 3 horas consecutivas. Colocar na estufa a 100°C por 30 minutos. Resfriar no dessecador e pesar.

Cálculo:

O extrato seco é expresso em g/L pela fórmula:

$$\text{Extrato seco (g/L)} = (1000 / 25) \times (a - b)$$

a = peso da cápsula com extrato

b = peso da cápsula

3. Acidez volátil

Material:

- aparelho de destilação de Cazenave-Ferré
- bureta de 10 mL
- erlenmeyer de 250 mL
- pipetas volumétricas de 10 e 20 mL

- balão volumétrico de 500 mL

Reagentes:

- solução de hidróxido de sódio 0,1 N
- solução alcoólica de fenolftaleína a 1%

Preparo da amostra:

Pipetar 20 mL da amostra para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água destilada.

Procedimento:

Pipetar 10 mL da amostra diluída no borbulhador e 250 mL de água destilada no gerador de vapor do aparelho de destilação. Levar a água à ebulição com a torneira de vapor aberta, para eliminar o ar do aparelho e, eventualmente o gás carbônico da água destilada. Em seguida, fechar a torneira para que o vapor de água borbulhe na amostra, arrastando os ácidos voláteis. Recolher 100 mL do destilado. Titular a acidez volátil do destilado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N em presença de fenolftaleína.

Cálculo:

Acidez volátil é expressa em g de ácido acético/100mL de amostra pela fórmula:

$$\text{Acidez volátil (g de ác. Acético/ 100 mL de amostra)} = \frac{n \times N \times Eq \times f}{10 \times V}$$

n = número de mL da solução de hidróxido de sódio gastos na titulação

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

Eq = equivalente grama de ácido acético (60)

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

V = volume da amostra no preparo

4. Cinzas

Material:

- cadinho de porcelana (ou platina) de 50 mL
- pipeta volumétrica de 25 mL
- bastonete de vidro
- banho-maria ou chapa aquecedora
- dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro
- balança analítica
- mufla
- bico de Bunsen

Procedimento:

Aquecer o cadinho ao redor de 600°C durante 10 minutos, resfriar no dessecador e pesar. Pipetar 25 mL da amostra no cadinho, evaporar completamente no banho-maria fervente (tomar cuidado para não deixar espirrar a amostra). Queimar em bico de Bunsen e passar o cadinho para a mufla a 550°C ± 25°C, até que o resíduo se torne claro. O tempo exigido para essa operação pode ser reduzido da seguinte maneira: remover o cadinho da mufla, esfriar, quebrar o resíduo ainda escuro com um bastonete de vidro, tomando o cuidado de lavar o bastonete com algumas gotas de água destilada, levar o cadinho em banho-maria até secar e colocar novamente na mufla até o resíduo ficar completamente claro. Esfriar o cadinho no dessecador e pesar rapidamente.

Cálculo:

As cinzas são expressas em gramas por litro de amostra pela fórmula

$$\text{Cinzas (g/L)} = (1000 / 25) \times (a - b)$$

a = peso do cadinho com as cinzas

b = peso do cadinho

5. *Grau alcoólico real*

Material:

- aparelho de destilação
- balão volumétrico de 200 mL
- proveta de 250 mL
- papel tornassol
- pérolas de vidro
- termômetro
- alcoômetro Gay Lussac de 0 a 10°GL

Reagentes:

- solução de hidróxido de sódio 5 N
- papel tornassol

Procedimento:

Medir 200 mL da amostra em balão volumétrico, anotando sua temperatura. Transferir para balão de destilação, colocando pérolas de vidro. Lavar o balão volumétrico 4 vezes com 5 mL de água destilada de cada vez, adicionando-a ao balão de destilação. Neutralizar com solução de hidróxido de sódio 5 N, usando papel tornassol como indicador. Conectar ao condensador e mergulhar este até o fundo do balão volumétrico de 200 mL, anteriormente empregado, que contém 100 mL de água destilada. Recolher cerca de $\frac{3}{4}$ do volume inicial. Resfriar este balão, mergulhando-o em água e gelo, durante a destilação. Completar o volume para 200 mL com água à mesma temperatura. Agitar, resfriar e transferir o destilado para uma proveta, no qual o alcoômetro seja introduzido e possa flutuar livremente. Fazer a leitura a 20°C.

O valor obtido é a porcentagem do álcool em volume ou grau Gay Lussac.

Para as análises de acidez total utilizou-se a metodologia usada para vinhos conforme as metodologias de análises de bebidas e vinagres do Laboratório Nacional de Referência Vegetal – LANARV, a seguir.

1. Acidez total

Material:

- bequer de 250 mL
- pipeta volumétrica de 10 mL
- bureta de 25 mL
- agitador magnético

Reagentes:

- solução de hidróxido de sódio 0,1 N
- solução alcoólica de fenolftaleína a 1%

Procedimento:

Pipetar 10 mL de amostra num bequer de 250 mL contendo 100 mL de água destilada e adicionar 1 a 2 gotas de solução de fenolftaleína (quando não for potenciométrica). Titular com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até a coloração rosa do indicador fenolftaleína.

Cálculo:

Acidez total é expressa em meq/L pela fórmula:

$$\text{Acidez total (meq/L)} = \frac{n \times N \times 1000}{V}$$

n = número de mL de solução de hidróxido de sódio gastos na titulação

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

V = volume de amostra tomado.

Ou em solução normal por cento v/v:

$$\text{Acidez total em solução normal por cento v/v} = \frac{n \times f \times 10}{V}$$

onde f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

Para as análises de pH e teor de SO₂ livre usou-se metodologias usadas no Laboratório de Vinhos da Cantina Experimental da EPAGRI – Videira, a seguir:

1. pH

Material:

- frasco erlenmeyer de 250 mL
- aparelho medidor de pH
- soluções tampão pH 7 e pH 4

Procedimento:

Utilizou-se uma amostra suficiente para cobrir o eletrodo do aparelho previamente calibrado e realiza-se a leitura direta no equipamento.

2. Teor de SO₂ livre (método Ripper simples)

Material:

- frasco erlenmeyer
- bureta de 35 mL

Reagentes:

- solução indicadora de amido a 2%
- solução de ácido sulfúrico 1:3
- solução de iodo N/50

Procedimento:

Pipetar 20 mL da amostra em um frasco erlenmeyer. Adicionar 2 mL da solução de amido 2% e 3 mL da solução de ácido sulfúrico. Titular com solução de iodo N/50 até mudança de coloração para cor azul intenso.

Cálculo:

$$\text{SO}_2 \text{ livre (meq/L)} = \text{n.º de mL gastos na titulação} \times 32$$

3.2.3 Análises cromatográficas

O método usado foi a análise por cromatografia gasosa da amostra injetada.

Princípio: injeção direta da amostra

Padrão interno: octanol-3

Modo de operação: 250 μ L da solução hidroalcoólica (40%) de octanol-3 é misturada com 2 mL de amostra e mais 2 mL de metanol. Após homogeneização, um volume de 1 μ L dessa solução é injetada manualmente.

Condições cromatográficas:

Aparelho: Cromatógrafo gasoso Varian 3400CX

Gás de arraste: Nitrogênio com fluxo de 2 mL/min

Gases da chama: Hidrogênio com vazão de 60 mL/min e ar artificial com vazão de 230 mL/min.

Razão de split flow: 1 : 10

Coluna: Tipo: DB-wax P/N 123-7033

Fornecedor: J&W Scientific

Fase: polietileno glicol

Comprimento: 30 m

Diâmetro: 0.32 mm

Detector: FID (ionização de chama) – 250°C

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A apresentação dos resultados deste trabalho está organizada em forma de três artigos, de modo a tratar de todos os objetivos inicialmente propostos.

O primeiro artigo descreve o estudo das características físico-químicas dos vinagres fabricados em escala laboratorial, os quais foram utilizados como referência para os estudos posteriores, principalmente por serem de origem conhecida, isto é, obtidos a partir de vinho tinto, vinho branco e solução alcoólica.

A produção de vinagres não se constituía em um objetivo principal mas a obtenção de vinagres com origem conhecida era importante para uma posterior análise e comparação com as amostras de vinagres comerciais.

Este artigo foi encaminhado para a Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA para avaliação e publicação em seu Boletim quadrimestral.

No segundo artigo, são abordadas as características físico-químicas das amostras de vinagres comerciais analisadas. Este artigo foi enviado ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná para publicação no *Boletim do CEPPA* (Curitiba – PR) e encontra-se em análise.

Esta caracterização físico-químicas dos vinagres comerciais possibilitou a obtenção de dados para um melhor conhecimento das características desses produtos.

O objetivo principal de analisar a concentração de acetoína em vinagres como forma de verificação de sua origem é enfocado e discutido no terceiro artigo, o qual encontra-se em fase de avaliação para posterior publicação pela revista indexada *Brazilian Journal of Food Technology* do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL (Campinas – SP).

A análise por cromatografia gasosa do teor de acetoína em vinagres produzidos em escala laboratorial e nas amostras de produtos comerciais foi realizada com o objetivo de se estudar a formação e conseqüente concentração de acetoína nesses produtos, de acordo com sua matéria-prima de origem, isto é, vinho tinto, vinho branco ou álcool. O ANEXO VI apresenta exemplos de cromatogramas de análise do teor de acetoína em algumas amostras.

4.1 ARTIGO 1

ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE VINAGRES DURANTE A FERMENTAÇÃO ACÉTICA¹

Sonia Yasuko TAKEMOTO^{2,*}, Jean Pierre ROSIER³, Jorge Luiz NINOW²

RESUMO

O aspecto mais importante na fermentação acética de soluções alcoólicas de origem agrícola é a oxidação biológica do etanol a ácido acético. Porém, outras substâncias em menores concentrações, também sofrem transformações ou são formadas, fornecendo ao produto final características típicas e importantes para sua qualidade. Utilizando-se um processo artesanal adaptado, produziu-se vinagres a partir de vinhos tinto e branco e de soluções alcoólicas, com o propósito de observar e acompanhar algumas características físico-químicas importantes para o produto final. A formação e concentração da acetoína, composto característico de processos fermentativos, também foi estudada. Os resultados evidenciaram diferenças entre os vinagres obtidos a partir de vinho e os vinagres de álcool, principalmente no teor de extrato seco e cinzas. A acetoína foi encontrada somente nos vinagres produzidos em laboratório a partir de vinho.

¹ Recebido para publicação em ___ / ___ / ___

² Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

³ EPAGRI – Estação Experimental de Videira – Santa Catarina

Palavras-chave: fermentação acética, vinagre, análises

SUMMARY

STUDY OF PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF VINEGARS DURING ACETIC FERMENTATION. The most important aspect of acetic fermentation of alcoholic solutions of agricultural origin is the biological oxidation of ethanol to acetic acid. However, other substances are also formed or transformed, at lower concentrations, which endow the final product with characteristic features important to its quality. By means of an adapted manufacturing process, vinegars were produced from red and white wines and alcoholic solutions, with the purpose of identifying and monitoring certain physico-chemical characteristics important to the final product. The formation and concentration of acetoin, a characteristic compound of fermentative processes, was also investigated. The results showed differences between vinegars produced from wines and vinegars produced from alcohol, mainly in dry extract and ash contents. Acetoin was found only in the vinegars produced from wines.

Keywords: acetic fermentation, vinegar, analysis

1. INTRODUÇÃO

O vinagre, assim como o vinho, é um alimento conhecido desde a Antigüidade. Originalmente, o vinagre era obtido não só de vinhos mas também de cervejas deixados ao ar; isto é, formava-se por fermentação espontânea [1, 8]. A fermentação alcoólica seguida da acética se produz espontaneamente sobre qualquer substrato açucarado exposto ao pó e aos insetos que transportam leveduras e bactérias. A acetificação também se realiza espontaneamente em vinhos e sidras de baixo teores de álcool expostos ao contato com o ar.

Acredita-se que as referências mais antigas sobre o vinagre sejam as citadas na cultura babilônica (5.000 anos antes de Cristo) sobre o processo de obtenção do vinagre de tâmaras [7]. A história do vinagre é cercada de lendas de personagens históricos. Segundo Cayo Plínio II, em sua *Historia Natural*, a rainha egípcia para ganhar uma aposta, a de gastar um milhão de sestércios em uma comida, dissolveu pérolas valiosas em vinagre e as bebeu [1, 7].

Diversos estudiosos se interessaram pelo estudo do vinagre ainda que, somente no século XVIII, alguns resultados mais próximos da realidade tenham sido publicados. Porém, somente em 1861, Pasteur em sua *Communication a la Société Chimique de Paris* (Seção 26/7/1861) descreve sua experiência para mostrar que sem a presença de um ser vivo, segundo ele, *Mycoderma aceti*, não ocorre a acetificação.

Em sua *Memoire sur la fermentation acetique*, publicada em 1864, nos *Annales Scientifiques de l'Ecole Normale Supérieure de Paris*, Pasteur reafirmava a necessidade de um "ser organizado" sem o qual um líquido alcoólico, vinho ou cerveja, mesmo que adicionado de sucos de frutas, água de cevada, ácido acético ou outros

substratos, em contato com o ar, não seriam acidificados sem o desenvolvimento de mycodermas, capazes de fixarem o oxigênio do ar “fazendo a combustão a um grau mais ou menos avançado das matérias dissolvidas, sobretudo do álcool e do ácido acético” [1, 4, 7].

Antes de se conhecer os microrganismos e sua forma de atuação, o vinagre era produzido de forma empírica, utilizando-se vinhos em países vinícolas como a França e Itália, álcool na Alemanha ou o arroz na China e no Japão [7].

Os métodos artesanais ainda hoje são utilizados para produção doméstica de vinagres em pequenas quantidades. Tais métodos não necessitam de grandes técnicas para sua utilização e consistem basicamente em deixar, por um longo tempo, geralmente num barril, um bom vinho adicionado de um vinagre turvo ou da “mãe do vinagre”. É um processo lento e a acetificação se dá pelo contato do substrato alcoólico com o ar, por meio das bactérias acéticas, agregadas por um polímero produzido pelos próprios microrganismos, que constituem a chamada “mãe do vinagre”. O produto obtido contém normalmente de 4 a 5 % de ácido acético e teor alcoólico semelhante. Estes vinagres artesanais apresentam ainda aroma e sabores peculiares devido ao método de fabricação empregado [7, 8].

Os processos industriais de fabricação de vinagres utilizam equipamentos conhecidos como vinagreiras, os quais oferecem diversos dispositivos para controle de temperaturas, aeração, acidez entre outros.

A legislação brasileira define como vinagre de vinho, o produto obtido da fermentação acética do vinho [2, 3] que deve conter uma acidez volátil mínima de 40 g/L expressa em ácido acético (4%). Sua graduação alcoólica não pode exceder a

1°GL e deve ser obrigatoriamente estabilizado. Um vinagre com mais de 80 g/L de acidez volátil é o concentrado de vinagre usado exclusivamente para diluição [3].

Um dos principais aspectos na produção de vinagres é a transformação de etanol em ácido acético. As bactérias acéticas oxidam o etanol em duas etapas. Na primeira etapa, o etanol é oxidado a acetaldeído e na segunda, o acetaldeído é oxidado a ácido acético [7].

A composição do vinagre de vinho é tão complexa quanto a da matéria-prima utilizada para a sua fabricação. A principal transformação durante a fermentação acética do vinho é a conversão do álcool etílico a ácido acético, porém diversas outras reações ocorrem, transformando ou formando substâncias. De forma geral, pode se dizer que a composição básica dos vinagres de vinho é dada pela água, seu maior componente; o ácido acético, proveniente do álcool etílico; álcool metílico; álcoois superiores; glicerina; ácidos procedentes da uva (tânico, tartárico, málico e cítrico); os ácidos procedentes da fermentação alcoólica (succínico e láctico); antocianinas; materiais pécticos e nitrogenados; substâncias minerais e aldeídos e ésteres formados pelas reações de oxiredução e esterificação durante as fermentações [4].

A acetoina ou acetilmetilcarbinol ($C_4H_8O_2$) é uma cetona (3-hidroxi-2-butanona) de odor agradável, peso molecular 88,10 e ponto de ebulição 148°C, é uma das substâncias comumente formada em fermentações por atividade microbiana de bactérias e leveduras [6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16; 17].

A acetoina faz parte do aroma de bebidas alcoólicas fermentadas e em alguns casos, transforma-se em um problema quando é oxidada a diacetil. O diacetil

apresenta odor característico que causa um decréscimo no *flavor* dessas bebidas sendo percebido em vinhos a níveis muito baixos (valor de *threshold* de 8 mg/L) [12].

Nos vinagres também se detecta a presença de acetoína já que durante a fermentação acética há uma produção dessa substância [17]. Segundo GERBI *et al* [5], em seu estudo da evolução de alguns componentes do vinho durante a acetificação, há um considerável aumento da acetoína, chegando a se obter um aumento de cerca de 700% no vinagre.

O objetivo deste estudo foi o de observar o desenvolvimento de características físico-químicas importantes nos vinagres e a formação de acetoína durante o processo de fermentação acética em escala laboratorial, utilizando como matéria-prima vinhos e soluções alcoólicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DE VINAGRES

2.1.1 Matérias-primas

Para a produção dos vinagres foram utilizados vinhos produzidos por microvinificações na Cantina Experimental da EPAGRI – Videira, a partir de uvas maduras e sãs das variedades *Isabel* e *Villenave* para vinhos tinto e branco, respectivamente.

O álcool utilizado para o preparo das caldas a serem acetificadas foi o tipo comercial, 94°GL adquirido em supermercados locais.

2.1.2 Microrganismos

Para a fermentação acética não é comum o uso de culturas puras. Emprega-se geralmente uma microflora mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies ou variedades dessa bactéria, que é considerada a mais eficiente.

Os microrganismos utilizados para a acetificação dos vinhos e álcool foram obtidos a partir de vinagres fortes provenientes de processos da indústria de vinagres Castelo.

2.1.3 Fermentação acética

Para a fermentação acética das matérias-primas previamente citadas foram utilizados "fermentadores" construídos experimentalmente a partir de recipientes de vidro fechados, providos de tubos de vidro para a aeração forçada feita por um aparelho borbulhador usado para aeração em aquários. O volume de ar usado variou entre 5 litros por hora por litro de calda a 8 litros de ar por hora por litro de calda.

A tampa do fermentador dispunha de orifícios tampados com algodão para permitir a saída de ar e retirada de amostras.

Os fermentadores foram mantidos em laboratório, à temperatura ambiente, durante todo o tempo do experimento.

As caldas de vinho tinto e branco foram preparadas por meio da diluição dos vinhos com álcool comercial e adicionados de vinagre forte (não pasteurizado e não diluído), contendo as bactérias acéticas. A mistura foi colocada no fermentador limpo e deixada para acetificar com aeração constante e baixa.

Para a calda de vinagre de álcool, procedeu-se a diluição do álcool com água fervida e resfriada para a obtenção de uma solução diluída com cerca de 4°GL. A solução foi aquecida a uma temperatura de 30°C para a adição do vinagre forte de álcool (não pasteurizado e não diluído), contendo as bactérias acéticas. A quantidade de vinagre forte a ser adicionada depende de seu teor de acidez e é determinada de forma a se obter uma calda com acidez acética final de 6%. Deve-se proceder também a adição de nutrientes essenciais para o crescimento dos microrganismos já que neste caso, a matéria-prima a ser fermentada apresenta deficiência desses nutrientes. Para o nosso caso, utilizou-se uma mistura pré-preparada e usada comercialmente, o *Acetozyn*, que contém todos os nutrientes necessários para o crescimento das bactérias acéticas, na proporção de um grama para cada litro de calda a ser fermentada.

A mistura foi colocada no fermentador previamente limpo e deixada para fermentar.

Foram realizadas cinco remontagens para cada acetificação biológica. Como o volume inicial foi de 2 litros de calda, a cada remontagem adicionou-se 250 mL de vinho ou álcool.

Após as remontagens, realizou-se as retiradas de amostras, adicionando-se igual quantidade de vinho ou álcool, toda vez que o teor alcoólico atingiu 1°GL ou o grau de acidez acética encontrava-se acima de 4,5 %.

O vinagre assim obtido, foi filtrado em papel filtro, pasteurizado a 65°C por 5 minutos e envasado.

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

As amostras foram retiradas dos fermentadores durante o processo de fermentação para avaliação do teor de acidez total e outras análises físico-químicas e cromatográficas para acompanhamento da acetificação. As análises foram realizadas logo após a retirada das amostras.

As determinações físico-químicas de extrato seco, acidez volátil, cinzas e grau alcoólico foram feitas conforme os métodos oficiais de análises para vinagres especificadas na Portaria N.º 076, de 27 de novembro de 1986. A densidade foi determinada diretamente por densímetro a 20°C.

Para as análises de acidez total utilizou-se a metodologia usada para vinhos conforme as metodologias de análises de bebidas e vinagres do Laboratório Nacional de Referência Vegetal – LANARV.

O teor de SO₂ livre foi determinado pelo método Ripper simples e o pH em leitura direta no pHmetro.

O teor de acetoina foi avaliado através de cromatografia gasosa, utilizando-se um cromatógrafo gasoso Varian 3400CX com coluna do tipo DB-wax P/N 123-7033, de fase em polietileno glicol, diâmetro 0,32 mm e comprimento 30 m e um detector de ionização de chama (DIC) a 250°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os vinhos utilizados para essa fabricação foram previamente analisados nas mesmas características acompanhadas posteriormente. Os resultados são mostrados a seguir, na Tabela 1.

Tabela 1 – Características dos vinhos utilizados para acetificação

Vinho	Densidade a 20°C (g/L)	Extrato seco a 100°C (g/L)	Acidez volátil (g de ác. acético/100 mL)	Acidez total (solução normal % V/V)	Cinzas (g/L)	Grau alcoólico real (°GL)	pH	Teor de SO ₂ livre (meq/L)
tinto	994,5	17,40	0,066	10,8	1,472	10,0	3,25	25,6
branco	991,1	16,88	0,042	12,0	1,368	12,3	3,17	25,6

O processo de fermentação utilizado para a produção dos vinagres foi uma adaptação do método artesanal. À tradicional forma de fabricar vinagres em pequena escala, que consiste apenas em misturar parte de vinagre forte (não diluído) contendo as bactérias acéticas, com a calda a ser acetificada, adaptou-se uma forma de aeração forçada. Esta aeração teve como objetivos propiciar melhores condições de oxidação e acelerar este processo que é considerado lento.

O tempo gasto para obter os produtos prontos foi bastante longo, cerca de quatro meses. Atribui-se este fato principalmente à falta de um controle rigoroso da temperatura do processo que não foi mantida constantemente próxima à temperatura ideal de acetificação, 28°C. A variação de temperatura, tanto para cima como para baixo de 28°C, diminui a velocidade de crescimento das células bacterianas e, conseqüentemente, a transformação do etanol em ácido acético.

Os vinagres obtidos podem ser considerados como bons produtos. Os teores de ácido acético nos produtos finais antes da diluição ficaram em torno de 4,5% e os teores finais de álcool próximos a zero.

Após a acetificação, o vinagre foi filtrado em papel filtro simples pois já se encontrava bastante límpido, diluído para uma concentração final de 4% em ácido acético e pasteurizado a uma temperatura de 65°C por 5 minutos antes de ser envasado.

O aspecto final do produto atendeu às características sensoriais previstas pela legislação: aspecto límpido, sem depósito; cheiro característico lembrando a vinho para os vinagres de vinho; cor amarelada para os vinagres de vinho branco, avermelhada para os vinagres de vinho tinto (intensidade de cor = 1,152, obtida pela soma das absorbâncias a 420, 520 e 620 nm) e branco para os vinagres de álcool; sabor ácido.

A Figura 1 mostra os vinagres prontos que foram produzidos em laboratório.

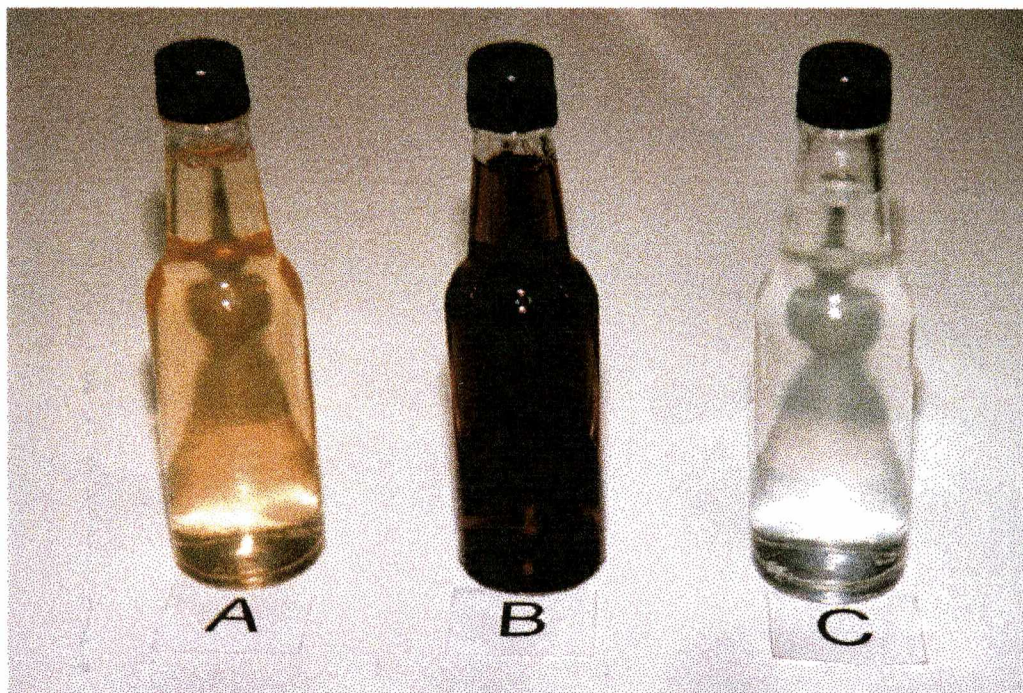


Figura 1 – Vinagres produzidos em laboratório: **A** – Vinagre de vinho branco; **B** – Vinagre de vinho tinto; **C** – Vinagre de álcool

Durante a etapa da elaboração de vinagres de vinho e álcool, um acompanhamento periódico através de análises físico-químicas foi realizado.

Os resultados deste acompanhamento da produção dos vinagres e as análises dos produtos obtidos são apresentados a seguir, nas Tabelas 2 e 3 para vinagres provenientes de vinho tinto e branco, respectivamente.

Tabela 2 – Características físico-químicas do vinagre de vinho tinto produzido em laboratório

Característica	Vinagre de vinho tinto							
	Calda inicial	1ª remontagem	2ª remontagem	3ª remontagem	4ª remontagem	5ª remontagem	1ª retirada*	Vinagre pronto*
Densidade a 20°C (g/L)	1008	1017	1014	1011	1014	1015	1015	1013
Extrato seco a 100°C (g/L)	9,08	23,31	21,84	22,47	18,86	18,69	22,18	18,03
Acidez volátil (g ác. acético/100 mL)	3,16	4,73	5,18	3,45	3,75	3,15	4,00	4,50
Acidez total (solução normal % v/v)	60,2	72,6	75,4	66,6	64,2	61,0	79,0	67,4
Cinzas (g/L)	0,856	1,996	1,984	1,952	1,676	1,724	1,920	1,616
Grau alcoólico real (°GL)	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
pH	2,88	2,97	3,00	2,78	2,58	2,67	2,92	2,24

*A "1ª retirada" representa o produto obtido com a primeira retirada após as remontagens. O "vinagre pronto" representa o produto obtido após a primeira retirada.

Tabela 3 – Características físico-químicas do vinagre de vinho branco produzido em laboratório

Característica	Vinagre de vinho branco							
	Calda inicial	1ª remontagem	2ª remontagem	3ª remontagem	4ª remontagem	5ª remontagem	1ª retirada	Vinagre pronto
Densidade a 20°C (g/L)	1008	1015	1010	1012	1011	1010	1014	1013
Extrato seco a 100°C (g/L)	11,73	21,84	12,30	14,15	13,81	14,24	14,06	11,42
Acidez volátil (g ác. acético/100 mL)	3,00	6,15	3,90	4,50	5,18	3,30	3,75	4,00
Acidez total (solução normal % v/v)	57,6	99,2	62,6	76,2	77,2	74,0	68,6	70,8
Cinzas (g/L)	0,804	1,668	1,036	1,192	1,168	1,228	1,248	1,104
Grau alcoólico real (°GL)	5,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
pH	2,93	2,77	2,85	2,77	2,79	2,80	2,43	2,51

Os vinagres de vinho branco e tinto obtidos encontram-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira [3]: acidez volátil mínima de 4 g/100 mL, extrato seco mínimo de 7 g/L (vinagres de vinho tinto) e 6 g/L (vinagres de vinho branco), teor de álcool residual máximo de 1°GL e teor de cinzas mínimo de 1 g/L.

Em comparação com dados citados por MECCA, ANDREOTTI & VERONELLI [8] para vinagres de vinho italianos, os teores de extrato seco estão dentro dos limites citados (10 a 25 g/L) mas para cinzas, o vinagre de vinho branco obtido apresenta teor inferior ao limite mínimo (1,3 a 3,5 g/L). Para os valores fixados pela legislação espanhola, 6,2 a 12,8 g/L de extrato seco para um vinagre com acidez de 4% e teor de cinzas entre 1 e 5 g/L, o vinagre de vinho tinto produzido apresenta valores de extrato seco superiores ao permitido e teores normais de cinzas. O vinagre de vinho branco mostra valores de extrato seco e cinzas dentro dos previstos.

Os resultados obtidos apresentam grande variação entre cada etapa para os valores de acidez volátil nas amostras, retiradas durante o processo de acetificação, que pode ser justificada pela falta de um controle rígido da temperatura de fermentação. A temperatura ideal para o crescimento das bactérias acéticas e consequentemente, para uma maior produção de ácido acético, fica próxima a 28°C [1, 7]. Com temperaturas ambientes mais baixas, o crescimento das células e a produção de ácido acético são menores. A variação da temperatura ambiente para abaixo da temperatura ideal ocorrida durante o período de realização do experimento representou provavelmente, a principal causa dessa variação nos resultados de acidez. Relativamente, esta variação pode ser desconsiderada pois todos os experimentos foram realizados no mesmo ambiente, durante o mesmo período.

Os resultados apresentados para os produtos prontos são correspondentes às amostras diluídas, com teores de acidez próximos ao mínimo estabelecido pela legislação, para que possam ser comparados com os produtos existentes no mercado.

A análise do teor de acidez total em % solução normal v/v objetivou principalmente a obtenção de um controle rápido do andamento do processo de acetificação. Trata-se de uma análise mais simples, que requer menor volume de amostra e, dessa forma, pode ser realizada com maior frequência. Embora a acidez total não seja atribuída somente à presença do ácido acético, já que outros ácidos orgânicos estão presentes no vinagre tais como o tartárico, cítrico e málico, o seu aumento relativo é um indicador do aumento do teor de ácidos, pois a produção mais significativa neste processo é a do ácido acético.

A análise do pH também é apenas indicativa já que os valores encontrados apresentam grande divergência pois essa medida é a soma das interações de diversas substâncias presentes na amostra com o eletrodo. Somente valores acima de 3,0 indicaram sinais de perdas do ácido acético produzido (por exemplo, por excesso de aeração) ou problemas com os microrganismos, tais como falta de substrato ou presença predominante de células muito velhas.

A Tabela 4 apresenta os resultados para o vinagre produzido em laboratório a partir de álcool.

Tabela 4 – Características físico-químicas do vinagre de álcool produzido em laboratório

Característica	Vinagre de álcool							
	Calda inicial	1ª remontagem	2ª remontagem	3ª remontagem	4ª remontagem	5ª remontagem	1ª retirada	Vinagre pronto
Densidade a 20°C (g/L)	1000	1002	1001	1001	1003	1005	1002	1005
Extrato seco a 100°C (g/L)	0,80	1,74	1,78	1,48	1,24	0,98	0,82	0,76
Acidez volátil (g ác. acético/100 mL)	2,55	2,70	3,15	3,60	3,60	3,75	4,00	4,20
Acidez total (solução normal % v/v)	42,6	44,2	43,2	50,0	55,0	68,4	74,8	74,2
Cinzas (g/L)	0,500	0,360	0,328	0,328	0,260	0,276	0,250	0,262
Grau alcoólico real (°GL)	4,7	3,0	2,3	1,8	1,1	0,9	1,1	0,9
pH	2,47	2,62	2,26	2,09	2,23	2,28	2,32	2,36

O vinagre de álcool produzido em laboratório apresentou características físico-químicas um pouco diferenciadas dos vinagres de vinho. Os resultados para a densidade, o teor de extrato seco e o teor de cinzas foram menores do que os encontrados para os vinagres de vinho. Este fato já era esperado e deve-se à diferença de composição entre as caldas utilizadas para a fabricação dos vinagres.

O vinho, matéria-prima utilizada para os vinagres de vinho, é rico em diversas outras substâncias além do etanol tais como açúcares, aldeídos, ácidos orgânicos, ésteres e outros, que durante a fermentação acética podem sofrer transformações bioquímicas ou simplesmente perpassarem pelo processo, enriquecendo o produto final e conferindo teores maiores para esses parâmetros quando em comparação com os vinagres de álcool. Já as soluções alcoólicas utilizadas para a fabricação de vinagre de álcool apresentam uma composição bem mais restrita, sendo formada basicamente por etanol o qual sofre a ação das bactérias acéticas sendo transformado à ácido acético.

O teor de acetoína das amostras de vinagres durante as diferentes etapas de fabricação também foi acompanhado e os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Teores de acetoína nos vinagres produzidos em laboratório

Estágio de fabricação	Teor de acetoína (mg/L)		
	Vinagre de vinho tinto	Vinagre de vinho branco	Vinagre de álcool
- calda inicial	78,94	12,00	0,00
- 1ª remontagem	225,79	58,50	0,00
- 2ª remontagem	560,53	97,76	0,00
- 3ª remontagem	336,46	97,69	0,00
- 4ª remontagem	402,43	94,00	0,00
- 5ª remontagem	556,48	66,34	0,00
- 1ª retirada	831,47	98,81	0,00
- vinagre pronto	713,14	163,40	0,00

Observa-se que a acetoína é um produto característico de vinagres de vinho e não de vinagres de álcool. Ambos os vinagres de vinho apresentaram formação desta molécula durante o processo de fermentação acética enquanto o vinagre de álcool não apresentou nenhum teor detectável desse composto durante sua fabricação.

A ausência de acetoína nos vinagres de álcool pode ser explicado pela inexistência de fontes alternativas de piruvato como ácidos orgânicos ou açúcares.

Os resultados obtidos comprovam a existência de concentrações de acetoína maiores nos vinagres de vinho tinto do que nos vinagres de vinho branco, o que concorda com resultados citados por LLAGUNO & POLO [7] e MECCA, ANDREOTTI & VERINELLI [8].

4. CONCLUSÕES

Apesar das reservas impostas pelas limitadas dimensões do experimento, foi possível acompanhar o desenvolvimento das principais características físico-químicas durante o processo de fermentação acética de vinhos e soluções alcoólicas.

Os parâmetros físico-químicos estabelecidos pela legislação brasileira são facilmente atingidos pelos vinagres produzidos em laboratório a partir do vinho durante a fermentação acética já que somente limites inferiores para acidez volátil e cinzas e um máximo de 1°GL são fixados.

As diferenças físico-químicas entre os vinagres produzidos em laboratório a partir de vinho e de álcool durante a acetificação ficaram evidenciadas nos teores de extrato seco e cinzas, os quais se apresentaram acentuadamente menores no último.

A análise da concentração de apenas um constituinte dos vinagres, a acetoína, permite concluir que as diferenças mais profundas encontram-se nas concentrações das diversas substâncias secundárias formadas durante as fermentações, tanto a alcoólica, como a acética que caracterizam os produtos finais. A acetoína foi encontrada somente em vinagres procedentes de vinho, sendo sua concentração maior nos vinagres de vinho tinto.

Sensorialmente os contrastes entre os dois tipos de vinagres também foram grandes. Os vinagres de vinho são ricos em aroma e sabor enquanto o vinagre de álcool apresenta somente sabor ácido e leve aroma característico de ácido acético.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AQUARONE, E, LIMA, U. A., BORZANI, W. 1983. **Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação**. São Paulo, Editora Edgard Blücher, 243 p.
- [2] BRASIL. **Lei No. 7.678 de 08 de Novembro de 1988**. Brasília: Imprensa Nacional, 1988.
- [3] BRASIL. **Decreto n.º 99.066 de 08 de Março de 1990**. Brasília: Imprensa Nacional, 1990.
- [4] CARBONELL, M. 1970. **Tratado de Vinicultura**. Barcelona, Editorial Aedos, 242 p.
- [5] GERBI, V., ZEPPA, G., ANTONELLI, A., NATALI, N. & CARNACINI, A. **Evoluzione dei Costituenti Principali del Vino e dei Sidro nel Corso dell'Acetificazione**. *Industrie delle Bevande*, XXIV, p. 241 – 246, 1995.
- [6] LEWIS, J., TODD, B & STANLEY, G. **Determination of diacetyl in wines**. *The Australian Grapegrower & Winemaker*, 398, p. 12 – 15, 1997.
- [7] LLAGUNO, C., POLO, M.C. 1991. **El Vinagre de Vino**. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 238 p.
- [8] MECCA, F., ANDREOTTI, R. VERONELLI, L. 1979. **L'Aceto**. Brescia: Edizione AEB, 433 p.
- [9] MORITZ, D. E. **Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aroma**. 1998. 111 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

- [10] PALACIOS, A.T., VILA, J., CALDERÓN, F. CALLEJO, M. J., COLOMO, B. y SUÁREZ, J.A. **Fraccion Aromatica de Vinos Tintos com Crianza Biologica**. Alimentaria, Julio – Agosto, p. 67 – 69, 1995.
- [11] de REVEL, G. P. **Le Diacetyle, les Composes Dicarbonyles el Leurs Produits de Reduction Dans le Vin**. 1992, 171 p. Thèse de Docteur. Université de Bordeaux II, France.
- [12] ROMANO, P. & SUZZI, G. **Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation**. Applied and Environmental Microbiology, 62, p. 309 – 315, 1996.
- [13] ROMANO, P., SUZZI, G., BRANDOLINI, V., MENZIANI, E & DOMIZIO, P. **Determination of 2,3-butanediol in high and low acetoin producers of Saccharomyces cerevisiae wine yeasts by automated multiple development (AMD)**. Letters in Applied Microbiology, 22, p. 299 – 302, 1996.
- [14] ROMANO, P., SUZZI, G., MORTIMER, R. & POLSINELLI, M. **Production of high levels of acetoin in Saccharomyces cerevisiae wine yeasts is a recessive trait**. Journal of Applied Bacteriology, 78, p. 169 – 174, 1995.
- [15] ROMANO, P., SUZZI, G., TURBANTI, L. & POLSINELLI, M. **Acetaldehyde production in Saccharomyces cerevisiae wine yeasts**. FEMS Microbiology Letters, 118, p. 213 – 218, 1994.
- [16] TEIXEIRA, R. M. **Otimização das Condições de Cultura para Produção de Acetoína por Hanseniaspora quilliermondii**. 1999. 109 p. Tese de Mestrado – Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

- [17] TRONCOSO GONZÁLES, A.M. & GUZMÁN CHOZAS, M. **Acetoin Content of Andalusian Vinegars**. *Sciences des Aliments*, 7, nº 3, p. 499 – 505, 1987.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao senhor Willians Thadeu Carnevalli pela colaboração e atenção dispensadas.

4.2 ARTIGO 2

CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DE VINAGRES BRASILEIROS

Sonia Yasuko Takemoto*
Jean Pierre Rosier**
Jorge Luiz Ninow***

RESUMO

O vinagre é um produto obtido a partir da fermentação acética de substratos alcoólicos diversos. Amostras de vinagres de vinho e de álcool brasileiros foram analisadas objetivando-se a caracterização desses produtos. Observou-se uma grande desuniformidade nas características físico-químicas principalmente para as amostras de vinagres de vinho. As amostras de vinagres de álcool apresentaram teores de extrato seco e cinzas menores que as amostras de vinagres de vinho. A determinação das concentrações de acetoína também foram realizadas. Os teores de acetoína para as amostras de vinagres de vinho tinto apresentaram grande variação, mas em geral, são maiores que os teores de acetoína encontrados nas amostras de vinagres de vinho branco. As amostras de vinagres de álcool, contrariamente ao esperado, apresentaram teores detectáveis de acetoína.

PALAVRAS-CHAVE: vinagres, análises, acetoína

SUMMARY

Vinegar is a product obtained from acetic fermentation of different alcoholic substrates. Samples of Brazilian wine vinegar and alcohol vinegar were analyzed with the purpose of characterizing these products. A large variation in the physico-chemical characteristics was noted, especially in the samples of wine vinegars. Samples of alcohol vinegars were lower in dry extract and ash content than wine vinegars. Analyses of acetoin content were also carried out. Acetoin content of red wine vinegar samples were varied, but in general it was higher than the values in white wine vinegar samples. Alcohol vinegar samples, contrary to the expected results, presented detectable quantities of acetoin.

KEY-WORDS: vinegars, analysis, acetoin

* Eng. de Alimentos – Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina
** Eng. Agrônomo – Doutor em Enologia, Pesquisador da EPAGRI – Estação Experimental de Videira – SC
*** Eng. Químico – Doutor em Processos Biotecnológicos, Professor do Depto. Eng. Química e Eng. de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina

1. INTRODUÇÃO

O vinagre, assim como o vinho, é um alimento conhecido desde a Antigüidade e seu nome, em quase todas as línguas ocidentais (com exceção do italiano, *aceto* do latino “*acetum*”, e do alemão, *essig*), provém do francês, *vinaigre*, ou vinho azedo (1, 5, 6, 7, 11). Entre suas principais aplicações, encontra-se seu uso como condimento e conservante na alimentação humana.

O estudo das características dos vinagres e conseqüentemente da sua qualidade é bastante comum principalmente em países com grande tradição na fabricação de vinagres de vinho como a Espanha e a Itália. LLAGUNO e POLO, SUÁREZ & LLAGUNO (6, 7, 9) em seus estudos estabelecem, além da determinação das principais características físico-químicas do produto, relações entre as mesmas a fim de assegurar maior qualidade aos vinagres de vinho.

Pela definição da palavra vinagre, vinho azedo, somente os procedentes do vinho mereceriam esta denominação. Porém, denominam-se vinagres a todos os produtos resultantes da fermentação acética de diversos substratos alcoólicos, adicionando ao nome do vinagre o do substrato correspondente. A legislação brasileira define como vinagre de vinho, o produto obtido da fermentação acética do vinho (3, 4) que deve conter uma acidez volátil mínima de 40 g/L expressa em ácido acético (4%). Sua graduação alcoólica não pode exceder a 1°GL e deve ser obrigatoriamente estabilizado. Um vinagre com mais de 80 g/L de acidez volátil é o concentrado de vinagre usado exclusivamente para diluição (4).

A mesma legislação permite que sejam usadas genericamente outras substâncias ou líquidos alcoólicos para a fermentação acética, desde que ao produto resultante seja acrescido o nome da matéria-prima após o termo vinagre (4). No Brasil, não é permitida a fabricação e venda de vinagre artificial, isto é, misturas diluídas de ácido acético glacial (4).

Estima-se que o consumo anual de vinagre no país seja de cerca de 150 milhões de litros (segundo dados informais da ANAVI – Associação Nacional dos Produtores de Vinagre). Este volume indica a importância deste produto para o setor vitivinícola nacional pois, logo após o consumo do vinho e da uva *in natura*, trata-se da maior demanda destes produtos. Apesar disto, poucos dados existem sobre as características e a qualidade dos produtos nacionais.

O objetivo principal deste trabalho foi o de estudar a composição dos vinagres comerciais nacionais a fim de se obter dados para um melhor conhecimento das características e qualidade desses produtos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

Neste estudo foram analisadas quinze amostras de vinagres de vinho tinto, dez amostras de vinagres de vinho branco e doze amostras de vinagres de álcool. Todas as amostras para cada tipo de vinagre eram de marcas diferentes e foram obtidas em supermercados.

As amostras foram recebidas em recipientes fechados e não receberam nenhum tratamento preliminar. Após classificação, foram abertas e analisadas em seguida.

2.2 Métodos Analíticos

As determinações físico-químicas de extrato seco, acidez volátil, cinzas e grau alcoólico foram feitas conforme os métodos oficiais de análises para vinagres especificadas na Portaria N.º 076, de 27 de novembro de 1986. A densidade foi determinada diretamente por densímetro a 20°C.

Para as análises de acidez total utilizou-se a metodologia usada para vinhos conforme as metodologias de análises de bebidas e vinagres do Laboratório Nacional de Referência Vegetal – LANARV (2). O pH foi determinado por leitura direta em pHmetro.

O teor de acetoina foi avaliado através de cromatografia gasosa, utilizando-se um cromatógrafo gasoso Varian 3400CX e coluna do tipo DB-wax P/N 123-7033, com fase em polietileno glicol, diâmetro 0,32 mm e comprimento 30 m e detector FID, a 250°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as análises físico-químicas das amostras de vinagres comerciais são mostrados nas Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3, para vinagres de vinho tinto, vinho branco e álcool, respectivamente.

Tabela 3.1 – Análises físico-químicas das amostras de vinagres comerciais de vinho tinto

Amostra	Densidade a 20°C (g/L)	Extrato seco a 100°C (g/L)	Acidez volátil (g de ác. acético/100 mL)	Acidez total (solução normal % V/V)	Cinzas (g/L)	Grau alcoólico real (°GL)	pH
A*	1008	17,12	4,20	70,2	2,208	1,2	2,78
B	1008	8,64	4,20	73,6	1,408	0,0	2,46
C	1011	9,40	4,35	74,0	1,368	0,0	2,93
D	1009	7,14	4,50	75,6	1,288	0,0	2,63
E	1011	12,08	4,20	82,6	1,304	0,0	2,61
F*	1001	14,27	3,75	45,0	2,160	4,7	2,97
G	1007	4,94	4,05	78,6	0,808	0,0	2,40
H	1011	13,21	4,20	75,4	1,296	0,0	2,50
I	1009	7,88	5,40	80,4	1,512	0,0	2,68
J	1008	7,72	4,05	71,2	1,848	0,0	2,48
K	1008	8,26	4,35	74,4	1,320	0,0	3,05
L	1010	7,99	3,90	80,8	1,238	0,0	2,74
M	1011	12,36	4,20	74,2	0,896	0,0	2,47
N	1048	115,32	3,75	84,0	2,060	0,0	2,80
O	1011	12,78	4,65	78,0	1,416	0,0	2,91
Média	1011,4	17,274	4,250	74,53	1,4753	0,39	2,694
DP	10,4	27,319	0,404	9,11	0,4196	1,23	0,209

* Vinagres artesanais da região de Videira

Tabela 3.2 – Análises físico-químicas das amostras de vinagres comerciais de vinho branco

Amostra	Densidade a 20°C (g/L)	Extrato seco a 100°C (g/L)	Acidez volátil (g de ác. acético/100 mL)	Acidez total (solução normal % V/V)	Cinzas (g/L)	Grau alcoólico real (°GL)	pH
A	1012	8,04	4,80	88,0	1,412	0,0	2,91
B	1008	8,08	3,45	70,4	2,072	0,0	2,46
C	1009	6,99	4,35	74,8	1,224	0,0	2,77
D	1011	9,66	4,35	72,8	1,214	0,0	2,76
E	1010	7,49	3,75	76,0	1,236	0,0	2,75
F	1010	6,83	5,25	97,0	1,237	0,0	2,62
G	1008	6,97	4,20	73,8	2,156	0,0	2,42
H	1010	6,58	4,35	71,8	1,236	0,0	2,94
I	1008	6,79	4,50	73,4	1,752	0,0	2,52
J	1009	8,09	3,75	77,2	1,261	0,0	2,69
Média	1009,5	7,550	4,280	77,52	1,4800	0,00	2,680
DP	1,4	0,940	0,530	8,404	0,3720	0,00	0,178

Tabela 3.3 – Análises físico-químicas das amostras de vinagres comerciais de álcool

Amostra	Densidade a 20°C (g/L)	Extrato seco a 100°C (g/L)	Acidez volátil (g de ác. acético/100 mL)	Acidez total (solução normal % V/V)	Cinzas (g/L)	Grau alcoólico real (°GL)	pH
A	1006	0,81	3,15	75,4	0,344	0,0	2,32
B	1006	0,83	6,00	77,4	0,448	0,0	2,36
C	1007	0,81	4,35	75,2	0,560	0,0	2,22
D	1005	1,04	3,75	78,6	0,180	0,0	2,41
E	1007	0,76	4,20	74,2	0,240	0,0	2,29
F	1007	0,64	4,50	79,8	0,520	0,0	2,26
G	1008	3,54	4,65	88,2	0,439	0,0	2,35
H	1006	2,86	4,35	72,6	0,572	0,0	2,45
I	1007	0,79	4,50	75,0	0,380	0,0	2,41
J	1007	0,78	4,95	79,0	0,460	0,0	2,23
K	1007	0,94	5,10	75,0	0,440	0,0	2,30
L	1005	0,64	4,20	74,8	0,436	0,0	2,81
Média	1006,5	1,203	4,475	77,10	0,4186	0,00	2,368
DP	0,9	0,950	0,703	4,11	0,1182	0,00	0,157

Os resultados das análises físico-químicas evidenciam características bem distintas para os diferentes tipos de vinagres comerciais analisados.

As amostras de vinagres de vinho tinto apresentaram teores de extrato seco superiores aos valores encontrados para as amostras de vinagres de vinho branco, que apresentaram média próxima a 7,5 g/L. Os valores médios de extrato seco dos vinagres de vinho analisados atendem às exigências da legislação brasileira. Das amostras estudadas,

somente 6,7% (amostra G) dos vinagres de vinho tinto não atendem ao mínimo estabelecido de 7 g/L. Quando comparados com valores citados como normais em literatura para vinagres de vinho italianos, 10 a 25 g/L, os valores médios ficam no limite inferior e abaixo, respectivamente, para vinagres de vinho tinto e branco. Esses resultados podem denotar uma tendência dos produtos nacionais ou caracterizar uma forma de diluição dos vinagres de vinho com um produto de menor teor de extrato seco, como por exemplo, vinagres de álcool.

O teor médio de cinzas das amostras de vinagres de vinho se apresentou semelhante tanto para o vinagre de vinho tinto como para o vinagre de vinho branco, com pequena diferença a maior para o primeiro. Das amostras de vinagres de vinho tinto, 13,3% (amostras G e M) não atendem à legislação nacional. Os resultados obtidos também encontram-se mais próximos aos limites inferiores quando comparados com valores estabelecidos pela legislação espanhola (1 a 5 g/L) e valores considerados normais para os produtos italianos (1,3 a 3,5 g/L). A mesma analogia anterior que diz respeito à adição de vinagres de álcool pode ser aplicada para esta análise.

Quanto à acidez volátil das amostras, 20,0% (amostras F e N) dos vinagres de vinho tinto, 30,0% (amostras B, E e J) dos vinagres de vinho branco e 16,7% (amostras A e D) dos vinagre de álcool apresentaram teores abaixo do mínimo exigido por lei (4% acidez volátil). Todas as amostras pertencem a diferentes marcas. A amostra I (6,7%) dos vinagres de vinho tinto e a amostra F (10,0%) dos vinagres de vinho branco, pertencentes a mesma marca, apresentaram acidez volátil acima de 5 g/100mL. Para os vinagres de álcool, 16,7% (amostras B e K) também apresentaram acidez volátil maior do que 5 g/100mL. Tanto os valores inferiores a 4% de acidez volátil como os valores muito superiores a isto, são atributos negativos ao produto. Ambos não condizem com sua especificação no rótulo e portanto, não representam as características do produto que está sendo adquirido.

Uma outra razão para essa variação da acidez volátil é o fato de essa característica pode ser facilmente despreendida durante o manuseio e/ou estocagem do produto se sua embalagem não fornecer proteção e vedação suficientes, o que representa também um fator indesejável. Outra suspeita, é o não controle desta característica pelo produtor de vinagre.

A amostra de vinagre de vinho tinto N apresenta características diferenciadas dos demais. Os valores demasiadamente altos de densidade, extrato seco e cinzas podem indicar a presença de açúcares adicionados ao mosto ou ao vinho. A análise do teor de açúcares desta amostra mostrou um resultado de 87,71 g/L em açúcares redutores (glicose), o que representa um valor muito alto para vinagres. Estes resultados indicam que esta amostra de vinagre deve ser originária de um vinho tinto doce.

O valor médio para o extrato seco dos vinagres de álcool, 1,3 g/L, assim como seu valor médio do teor de cinzas, 0,4 g/L, são bastante inferiores aos valores para os vinagres de vinho. Mais uma vez evidencia-se a facilidade em caracterizar e diferenciar os vinagres de álcool dos vinagres de vinho através de análises físico-químicas bem simples.

A Figura 3.1 mostra uma comparação entre os resultados de extrato seco para as amostras de vinagres analisadas.

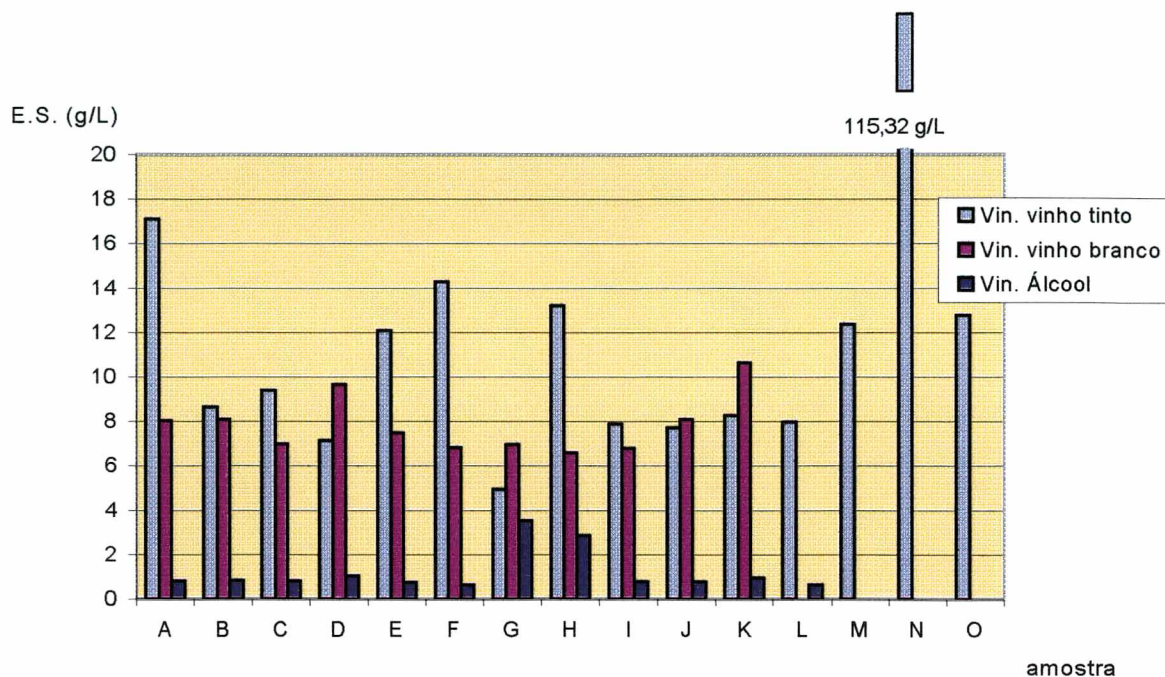


Figura 3.1 – Comparação entre os teores de extrato seco dos diferentes tipos de vinagres analisados

As amostras de vinagre de álcool comercial G e H, apresentam valores de extrato seco bem maiores do que a média, o que pode significar a adição de alguma substância não volátil. A análise dos resultados dos vinagres de álcool é bastante difícil por não se encontrarem parâmetros melhor definidos e nem dados de pesquisa para o produto.

Os resultados do teor de acetoina para as amostras de vinagres comerciais analisados encontram-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Teores de acetoína nas amostras de vinagres comerciais

Amostra	Teor de acetoína (mg/L)		
	Vinagre de vinho tinto	Vinagre de vinho branco	Vinagre de álcool
A	*427,16	199,90	5,44
B	110,12	59,65	1,77
C	121,71	16,08	9,17
D	27,93	9,55	9,88
E	19,24	7,63	14,62
F	*12,45	15,72	15,95
G	40,27	41,91	4,77
H	186,09	241,06	3,38
I	4,71	36,86	0,00
J	63,23	258,28	10,93
K	18,73	–	21,90
L	57,63	–	7,06
M	437,43	–	–
N	377,93	–	–
O	326,55	–	–

* Vinagres artesanais da região de Videira - SC

A Tabela 3.5 apresenta uma classificação das amostras de vinagres comerciais analisadas conforme dados encontrados na literatura. O valor de 40 mg/L é o mínimo estabelecido pela legislação espanhola. Para Mecca (8), os valores normais ficam entre 80 e 800 mg/L. Os valores mais freqüentemente encontrados e citados na literatura estão entre 200 e 500 mg/L.

Tabela 3.5 – Percentuais das amostras analisadas conforme seu teor de acetoína

Vinagre	Teor de acetoína (mg/L)			
	abaixo de 40	entre 40 e 80	entre 80 e 200	acima de 200
de vinho tinto nacionais	33,3%	20,0%	20,0%	26,7%
de vinho branco nacionais	50,0%	20,0%	10,0%	20,0%
de álcool	100,0%	–	–	–

Pela legislação espanhola, 33,3% dos vinagres de vinho tinto e 50,0% dos vinagres de vinho branco analisados seriam considerados não de acordo. Para os vinagres de vinho nacionais, tinto e branco, somente 23,4% apresentaram teores acima de 200 mg/L, considerados normais para vinagres espanhóis e italianos.

As diferenças em relação aos vinagres de álcool foram evidenciadas através desta análise. Todas as amostras comerciais apresentam quantidades muito inferiores a 40 mg/L, o que é perfeitamente explicável, pois a calda (solução diluída de álcool e vinagre) usada para a fabricação destes produtos não contém substâncias necessárias para a produção de acetoína, tais como os carboidratos e ácidos orgânicos que constituem as fontes adicionais de piruvato que levam à biossíntese de acetoína (5, 10, 12).

Os baixos valores de acetoína detectados na análise das amostras de vinagres comerciais de álcool pode ser devido ao metabolismo de células mortas, o que constituiria uma fonte adicional de piruvato para as outras bactérias ou por já se encontrarem presente no álcool utilizado para a preparação da calda pois as leveduras também são capazes de sintetizar este composto, em pequenas quantidades, durante a fermentação alcoólica.

4. CONCLUSÕES

Através das análises físico-químicas das amostras comerciais, conclui-se que os vinagres de vinho nacionais apresentam uma falta de padronização em suas características físico-químicas.

As amostras de vinagres de vinho tinto analisadas foram as que apresentaram maior diferença nos resultados de suas análises físico-químicas. A falta de uniformidade das amostras comerciais analisadas ficou evidenciada pelos resultados encontrados para o teor de extrato seco: o menor valor foi de 7,14 g/L e o maior valor, 115,32 g/L. Os valores para acidez volátil também apresentaram grande variação indicando inclusive a existência de amostras com valores inferiores ao valor mínimo legal.

As amostras de vinagres de vinho branco comerciais analisadas apresentaram maior uniformidade em suas características físico-químicas do que os vinagres de vinho tinto.

As amostras de vinagres de álcool analisadas mostraram que esse tipo de vinagre apresenta teores de extrato seco e cinzas bem menores do que os vinagres de vinho e também não uniformes.

As amostras de vinagres de vinho tinto apresentaram maiores teores de acetoína do que as amostras de vinagres de vinho branco, apesar de bastante variadas. As amostras de vinagres de álcool analisadas apresentaram teores bem mais baixos do que as amostras de vinagres de vinho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AQUARONE, E, LIMA, U. A., BORZANI, W. Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação. São Paulo, Editora Edgard Blücher, 1983, 243 p.
- 2 BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Metodologia de Análise de Bebidas e Vinagres. Brasília: Imprensa Nacional, 1986, 67 p.
- 3 BRASIL. Lei No. 7.678 de 08 de Novembro de 1988. Brasília: Imprensa Nacional, 1988.
- 4 BRASIL. Decreto n.º 99.066 de 08 de Março de 1990. Brasília: Imprensa Nacional, 1990.

- 5 LLAGUNO, C., POLO, M.C. El Vinagre de Vino. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 1991, 238 p.
- 6 LLAGUNO, C. Quality of Spanish Wine Vinegars. Process Biochemistry, 12 (8), 1977, p. 17 – 19, 44, 46.
- 7 LLAGUNO, C. Spanish Wine Vinegars. Process Biochemistry, 6 (5), 1971, p. 27 – 28 & 33.
- 8 MECCA, F., ANDREOTTI, R. VERONELLI, L. 1979. L'Aceto. Brescia: Edizione AEB, 433 p.
- 9 POLO, M. C., SUÁREZ, M. A. & LLAGUNO, C. Aportación al estudio de los vinagres españoles. I. Contenido en aminoácidos libres y nitrógeno total. ATA, 16 (2), 1976, p. 257 – 264.
- 10 de REVEL, G. P. Le Diacetyle, les Composes Dicarbonyles e Leurs Produits de Reduction Dans le Vin. Bordeaux, 1992. 171 p. Thèse de Docteur, Université de Bordeaux II.
- 11 RIZZON, L. A. & MIELE, A. 1998. Características Analíticas de Vinagres Comerciais de Vinhos Brasileiros. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, 1(1,2), p. 25-31.
- 12 ROMANO, P. & SUZZI, G. 1996. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. Applied and environmental microbiology. 62, p. 309 – 315.

4.3 ARTIGO 3

TEOR DE ACETOÍNA EM VINAGRES

Sonia Yasuko TAKEMOTO, Jean Pierre ROSIER, Jorge Luiz NINOW

RESUMO

A acetoína é um produto comumente produzido em processos fermentativos tanto por leveduras como por bactérias. A acetoína, juntamente com o diacetil e 2,3-butanodiol são importantes componentes do aroma de uma vasta gama de produtos lácticos, tais como queijos e manteiga. O teor de acetoína encontrado em vinhos geralmente é baixo e sua presença em vinhos não é muito desejada principalmente por tratar-se de uma substância derivada do diacetil o qual apresenta forte odor característico. Nos vinagres, o teor de acetoína encontrado é bastante superior ao dos vinhos e sua determinação está associada com a qualidade do produto, sendo um procedimento comum em países de produções tradicionais, como a Espanha e Itália. No Brasil, não há trabalhos publicados que mostrem os valores encontrados em nossos vinagres. O objetivo deste trabalho foi o de realizar um estudo sobre a presença da acetoína em vinagres de procedência conhecida, relacionando-a com sua genuinidade, através de uma metodologia simples e prática. Teores de acetoína em vinagres comerciais também foram pesquisados. Para os vinagres de vinho produzidos em laboratório, os teores de acetoína encontrados estão de acordo com os valores comumente citados na bibliografia, sendo maior para o vinagre de vinho tinto. O

vinagre de álcool produzido não apresentou teores de acetoína detectáveis. As amostras de vinagres de vinho comerciais nacionais analisadas apresentaram valores de acetoína variando entre 4,71 e 437,43 mg/L e as amostras de vinagres de álcool comerciais apresentaram teores de acetoína em uma faixa mais baixa, entre 0 e 21,90 mg/L.

PALAVRAS-CHAVE: acetoína, análises, vinagre

SUMMARY

ACETON CONTENT IN VINEGARS

Acetoin is a common product in fermentative processes in yeasts and bacteria. Acetoin, associated with diacetyl and 2,3-butanediol, is an important compound in the flavor of several dairy products such as cheeses and butter. The acetoin content in wines is generally low and its presence is undesirable since it is a substance derived from diacetyl, which presents a strong and characteristic odor. In vinegars, acetoin content is much higher than the one in the wine and its determination, which is associated with the quality of the product, is a common procedure in amongst traditional producers of wine vinegars in countries such as Spain and Italy. At present, there is no literature that reports acetoin content in Brazilian vinegars. The aim of this work was to study the acetoin content of vinegars of known origin, relating it to their authenticity, through a practical and simple method. Acetoin contents in commercial vinegars was

also investigated. The results for wine vinegars produced in the lab were in agreement with acetoin contents commonly reported in papers, being higher for red wine vinegar. Alcohol vinegar did not contain detectable acetoin. The commercial samples of Brazilian wine vinegars analyzed presented acetoin concentrations between 4,71 and 437,43 mg/L and the commercial samples of alcohol vinegars presented acetoin concentrations at a lower level, between 0 and 21,90 mg/L.

KEY-WORDS: acetoin, analysis, vinegar

1. INTRODUÇÃO

A análise de vinagres com finalidades de comprovar sua origem e qualidade é um assunto de grande interesse, principalmente dos países que tradicionalmente o fabricam a partir de vinhos. Estes países consideram como vinagre somente o produto obtido a partir de vinhos e posicionam-se contra qualquer outro método de fabricação de vinagre que não a acetificação, transformação bioquímica do etanol contido no vinho a ácido acético, pela ação de bactérias acéticas.

No início, as análises físico-químicas buscavam identificar principalmente a adulteração do produto através da adição de ácido acético obtido pela síntese química do etileno ou pela destilação seca da madeira, já que era este o componente determinante do valor dos vinagres.

Atualmente, com o desenvolvimento de sofisticadas metodologias de análise, já é possível até a identificação do isótopo C^{14} (carbono 14) em toda substância que

contenha carbono, e conseqüentemente, a determinação de sua concentração no produto em estudo. A presença deste isótopo em quantidades significativas, comum em compostos de origem biológica, não é observada em substâncias obtidas por síntese, como o ácido acético sintético ou o etanol derivado do petróleo (LLAGUNO, 1977; GIL DE LA PEÑA *et al*, 1976). Contudo, estes métodos ainda são bastante específicos e necessitam de equipamentos não comuns em laboratórios de análises.

Diversas são as formas de adulterações dos vinagres e a detecção dessas alterações constitui um difícil problema para os pesquisadores.

Uma das análises de componentes do vinagre que busca estabelecer relações entre sua concentração e a qualidade comprovada do produto, é a determinação do teor de acetoína.

A acetoína ou acetilmetilcarbinol ($C_4H_8O_2$) é uma cetona (3-hidroxi-2-butanona) de odor agradável, peso molecular 88,10 e ponto de ebulição 148°C. É um produto comumente formado em fermentações por atividade microbiana de bactérias lácticas e leveduras (TEIXEIRA, 1999; MORITZ, 1998; LEWIS *et al*, 1997; PALACIOS *et al*, 1995; ROMANO & SUZZI, 1996; ROMANO *et al*, 1994, 1995; de REVEL, 1992; TRONCOSO & GUZMÁN, 1987).

A acetoína é um composto comum em produtos fermentados como bebidas e queijos. Em vinhos, pequenas quantidades de acetoína são encontrados, ficando sua concentração, geralmente entre 10 e 80 mg/L (ROMANO & SUZZI, 1996; PALACIOS *et al*, 1995). TRONCOSO & GUZMÁN (1987) citam como quantidades normais de acetoína encontradas em vinhos teores de 7 a 15 mg/L. Nos vinagres também se detecta a presença de acetoína já que, durante a fermentação acética, há uma

produção dessa substância (TRONCOSO & GUZMÁN, 1987). Segundo GERBI *et al* (1995), em seu estudo da evolução de alguns componentes do vinho durante a acetificação, há um considerável aumento da acetoína, chegando a se obter um aumento de cerca de 700% no vinagre.

Pode-se dizer que a quantidade de acetoína presente nos vinagres está geralmente associada à qualidade dos mesmos porque é um composto tipicamente produzido durante o processo de acetificação (GERBI *et al*, 1995; TRONCOSO GONZÁLES & GUZMÁN CHOZAS, 1987). Este fato tem sido bastante utilizado para diferenciar vinagres de origem fermentativa dos vinagres artificiais, já que nenhuma acetoína é encontrada neste último tipo de produto.

Na maioria das bactérias, a acetoína é formada a partir do piruvato e é portanto, um produto do metabolismo de carboidratos. Em geral, pouca ou nenhuma acetoína é produzida a partir de carboidratos sem a presença de uma fonte adicional de piruvato. Uma fonte comum é o citrato. O citrato é transportado para dentro da célula por uma permease induzível e é quebrado em acetato e oxaloacetato, que é então descarboxilado a piruvato. Duas moléculas de piruvato condensam-se formando o α -acetolactato, que é descarboxilado formando acetoína, posteriormente convertida em butanodiol (CARVALHO, 1999; de REVEL, 1992).

É interessante ressaltar que o tipo de processo fermentativo utilizado também influencia nos teores finais de acetoína nos vinagres já que no processo de fermentação submerso quantidades menores de acetoína são formadas, enquanto valores bem maiores são encontrados quando outros processos são utilizados (TRONCOSO GONZÁLES & GUZMÁN CHOZAS, 1987). LLAGUNO & POLO (1991) citam como valores até 400 mg/l de acetoína para acetificadores de recheio e valores

próximos a 100 mg/l para processos submersos e afirma ainda, que há casos em que chega a se obter vinagres com 1g/l de acetoína (LLAGUNO & POLO, 1991). Já em 1979, MECCA *et al* afirmava que os vinagres de vinho apresentam valores entre 80 a 800 mg/l de acetoína, sendo esta concentração uma indicação da integridade química e / ou da alteração do produto.

Em um estudo realizado com vinagres italianos, GERBI *et al* (1995) utilizando um acetificador similar ao reator industrial Frings, encontraram valores de 276 mg/l de acetoína em seu produto final obtido a partir de vinho branco, que continha no início 20 mg/l de acetoína. Neste mesmo estudo, os autores afirmam em suas conclusões que a determinação de concentrações de substâncias tais como acetoína, diacetil e acetato de etila é indicada para avaliar o grau de adulteração de vinagres pois a variação de suas concentrações no produto formado é muito elevada.

Em outro estudo sobre os vinagres espanhóis, TRONCOSO GONZÁLES & GUZMÁN CHOZAS (1987) encontraram um valor médio de 394 mg/l de acetoína nas amostras analisadas. Nenhuma das amostras mostrou uma concentração de acetoína abaixo de 200 mg/l. A maioria das amostras dos vinagres estudados apresentou resultados entre 200 a 500 mg/l.

A legislação espanhola para vinagres estabelece uma concentração mínima de 40 mg/l para seus produtos. A legislação italiana não estabelece limites para os teores de acetoína. A Comissão de Enologia Internacional tem também se interessado por este assunto e já apresentou para aprovação final em sua Assembléia Geral realizada em junho/2000, em Paris, uma metodologia para a determinação do teor de acetoína em vinagres de vinho (ESCRITÓRIO INTERNACIONAL DA VINHA E DO VINHO, 2000).

No Brasil, não há resultados publicados sobre o teor deste composto em vinagres.

Neste estudo, buscou-se apresentar uma contribuição às metodologias de verificação da genuinidade de vinagres brasileiros. Para tanto, estabeleceu-se uma metodologia rápida de determinação da concentração de acetoína em vinagres, avaliando-se o teor deste composto em vinagres brasileiros, além de estudar sua presença em vinagres produzidos em escala laboratorial a partir de vinho tinto, vinho branco e álcool.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras

Para a análise do teor de acetoína utilizou-se dois grupos de amostras, o primeiro constituído de dezesseis amostras de vinagres de vinho tinto, onze amostras de vinagres de vinho branco e doze amostras de vinagre de álcool obtidos vinagres comerciais obtidos em supermercados, e o segundo grupo, constituído de amostras de vinagres produzidos em laboratório.

Duas amostras de vinagre de vinho tinto e uma amostra de vinagre de vinho branco importadas, além de uma amostra de vinagre de mel também foram avaliadas e seus resultados enfocados como indicadores ao nosso estudo.

2.2 Métodos Analíticos

O método usado para a determinação do teor de acetoína foi a análise por cromatografia gasosa da amostra injetada.

O padrão interno utilizado é o octanol-3 diluído em solução hidroalcoólica (40%). Um volume de 1 μL da mistura de 2 mL da amostra com 2 mL de metanol e 250 μL da solução de padrão interno é injetada diretamente no cromatógrafo.

O gás de arraste usado foi o nitrogênio com fluxo de 2 mL/min. Os gases da chama utilizados foram o hidrogênio, com vazão de 60 mL/min e ar artificial, com vazão de 230 mL/min.

A coluna usada para as análises é do tipo DB-wax P/N 123-7033, com fase em polietileno glicol e o detector tipo FID (ionização de chama), a 250°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através de análise em cromatografia gasosa, identificou-se os teores de acetoína das amostras de vinagres. Para os teores de acetoína dos vinagres produzidos em laboratório, os resultados são mostrados na Figura 3.1.

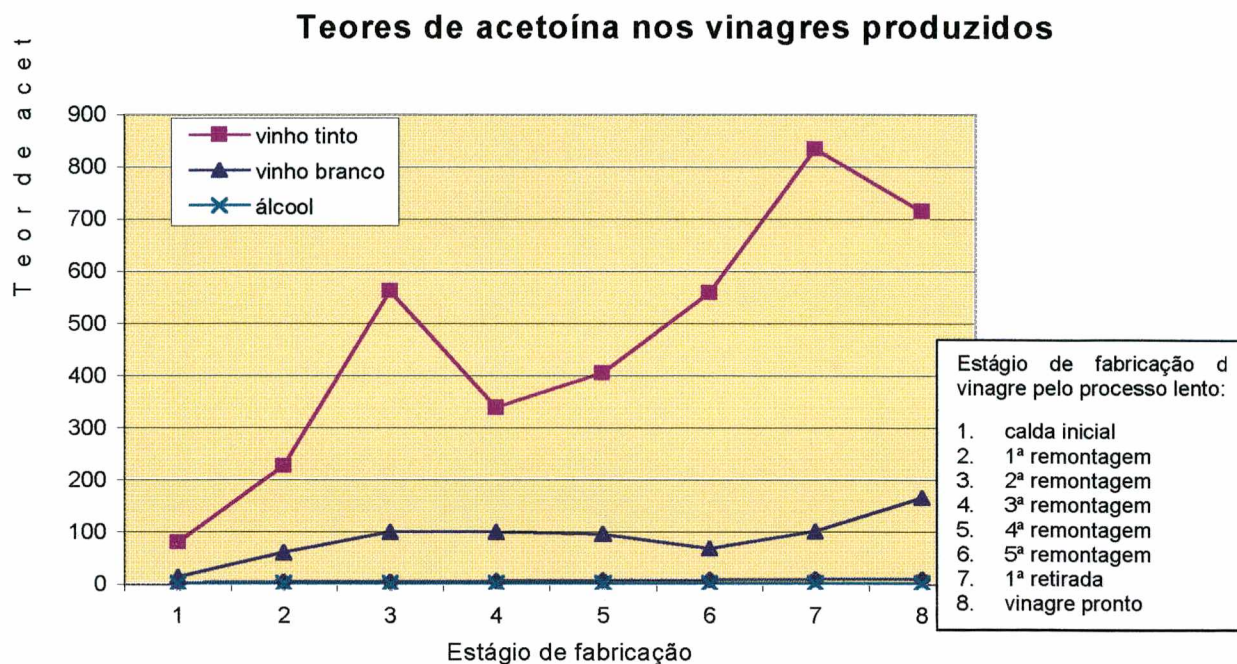


Figura 3.1 – Teores de acetoína nos vinagres produzidos experimentalmente

Os resultados encontrados para os vinagres produzidos em laboratório evidenciam a produção de acetoína nos vinagres de vinho tinto e branco em quantidades significativas, chegando a ser sete vezes maior do que o valor inicial na calda de vinho tinto, o que comprova os valores citados por GERBI *et al* (1995) e MECCA *et al* (1979).

Os resultados para o vinagre de vinho branco não apresentaram o mesmo aumento do teor de acetoína que o vinagre de vinho tinto no produto final, o que já era esperado. Contudo, também mostram uma produção significativa do composto analisado e estão de acordo como os valores citados em literatura, chegando a ser quatro vezes maior do que o valor mínimo determinado pela legislação espanhola. Pode-se atribuir esta maior produção de acetoína nos vinagres obtidos a partir de vinho tinto à maior concentração de citratos existentes nos vinhos tintos do que nos vinhos

brancos. Para este estudo, o vinho tinto usado para a fabricação de vinagre continha cerca de três vezes mais ácido cítrico (0,44 g/L) do que o vinho branco (0,14 g/L) utilizado para a elaboração de vinagre de vinho branco. Este resultado confirma a via metabólica utilizada pelas bactérias acéticas citada por CARVALHO (1999), ROMANO & SUZZI (1996) e de REVEL (1992) para a formação da acetoína: citrato → oxaloacetato → piruvato → α -acetolactato → acetoína. Segundo LLAGUNO & POLO (1991), também a presença de lactatos é importante para a formação de acetoína. O vinho tinto utilizado também apresentava maior teor de ácido láctico (3,41 g/L) do que o vinho branco (2,57 g/L), já que no vinho tinto é realizada a fermentação malolática, que transforma o ácido málico em ácido láctico, o que reforça a maior produção de acetoína no produto obtido de vinho tinto

Para o vinagre de álcool produzido em laboratório, os resultados comprovam a necessidade de outras fontes que não o etanol para a formação de acetoína pelas bactérias acéticas. Nenhum teor de acetoína foi encontrado no vinagre produzido a partir de álcool.

Os valores para as amostras de vinagres comerciais analisados encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Teores de acetoína nas amostras de vinagres comerciais

Amostra	Teor de acetoína (mg/L)		
	Vinagre de vinho tinto	Vinagre de vinho branco	Vinagre de álcool
A	*427,16	199,9	5,44
B	110,12	59,65	1,77
C	121,71	16,08	9,17
D	27,93	9,55	9,88
E	19,24	7,63	14,62
F	*12,45	15,72	15,95
G	40,27	41,91	4,77
H	186,09	241,06	3,38
I	4,71	36,86	0,00
J	63,23	258,28	10,93
K	18,73	**582,04	21,90
L	57,63	–	7,06
M	437,43	–	–
N	377,93	–	–
O	326,55	–	–
P**	**359,08	–	–
Q**	**725,69	–	–

* Vinagres artesanais da região de Videira

** Vinagres importados (espanhol ou italiano)

A amostra de vinagre de mel apresentou um resultado de 254,87 mg de acetoína por litro de produto.

A Figura 3.2 apresenta uma classificação das amostras de vinagres de vinho comerciais analisadas conforme dados encontrados na literatura. O valor de 40 mg/L é o mínimo estabelecido pela legislação espanhola. Para MECCA *et al* (1979), os valores normais ficam entre 80 e 800 mg/L. Os valores mais frequentemente encontrados e citados na literatura estão entre 200 e 500 mg/L.

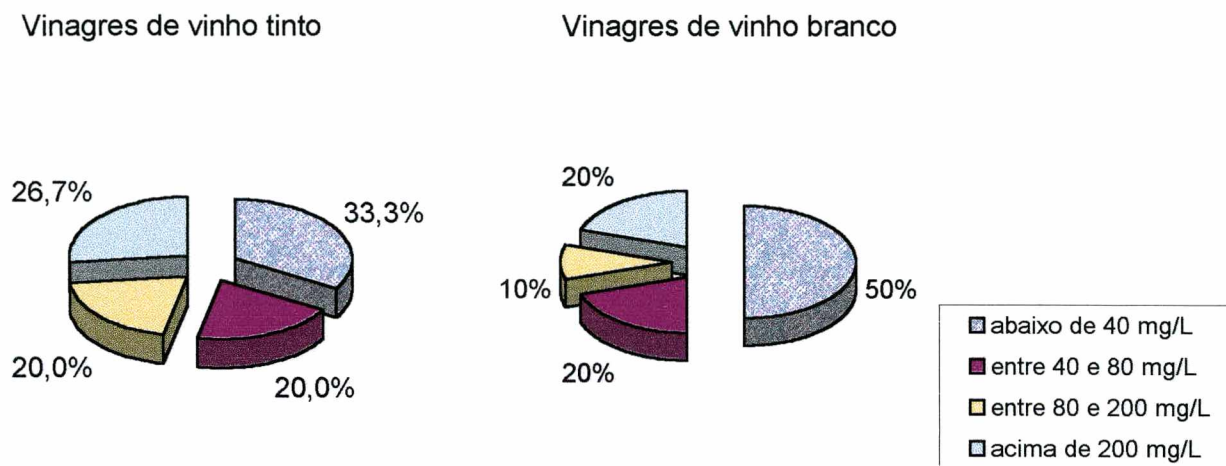


Figura 3.2 – Distribuição das amostras de vinagres de vinho nacionais conforme seu teor de acetoína

Pela legislação espanhola, 33,3% das amostras nacionais de vinagres de vinho tinto e 50,0% dos vinagres de vinho branco analisados seriam considerados não de acordo. Os vinagres importados apresentaram resultados superiores a 200 mg/L, o que reforça as citações em publicações da área. Do total de amostras de vinagres de vinho nacionais, tintos e brancos, somente 23,4% apresentaram teores acima de 200 mg/L, considerados normais para vinagres espanhóis e italianos.

As diferenças em relação aos vinagres de álcool ficaram mais evidenciadas através desta análise. Todas as amostras comerciais apresentam quantidades muito inferiores à 40 mg/L, o que é perfeitamente explicável, pois a calda (solução diluída de álcool e vinagre) usada para a fabricação destes produtos não contém substâncias necessárias para a produção de acetoína, tais como os carboidratos e ácidos orgânicos que constituem as fontes adicionais de piruvato que levam à biossíntese de acetoína.

Os baixos valores detectados na análise das amostras de vinagres comerciais de álcool podem ser devido ao metabolismo de células mortas, o que constituiria uma fonte adicional de piruvato para as outras bactérias ou por já se encontrarem presente no álcool utilizado para a preparação da calda pois as leveduras também são capazes de sintetizar este composto em pequenas quantidades durante a fermentação alcoólica, principalmente na fase inicial (ROMANO & SUZZI, 1996).

Uma forma comum de adulteração em alguns países, inclusive o Brasil, é a mistura de vinagres produzidos em laboratório a partir do álcool com vinhos ou com vinagres de vinho, a fim de fazê-los passar por vinagres de vinho. Neste caso, os valores para o teor de acetoína encontrados, provavelmente seriam baixos pois nem o vinagre de álcool nem o vinho possuem quantidades significativas de acetoína. Caso o vinagre de vinho, principalmente o tinto, contenha um teor de acetoína muito alto (próximo a 500 mg/L), sua diluição com vinagre de álcool poderia dar teores razoáveis de acetoína, porém seu teor de extrato seco continuaria alterado, isto é, inferior aos valores normais para os vinagres de vinho.

4. CONCLUSÕES

A análise do teor de acetoína em vinagres de vinho e de álcool permite observar que há uma relação entre sua concentração e a matéria-prima de origem do vinagre.

Verificou-se que os vinagres de vinho produzidos em laboratório apresentaram teores consideráveis de acetoína, enquanto o vinagre obtido a partir da fermentação

acética de soluções diluídas de álcool, não apresentou teor de acetoína detectável pela metodologia utilizada.

Pode-se afirmar assim que a acetoína é um composto característico em vinagres obtidos da acetificação biológica de vinhos e não característico em vinagres obtidos a partir da fermentação acética de soluções alcoólicas, sendo, portanto, desejável sua presença em concentrações significativas nos vinagres originários de vinho.

As amostras de vinagres de vinho nacionais analisadas mostraram grande variação na concentração de acetoína em suas composições evidenciando uma desuniformidade desta característica nos vinagres brasileiros. Os teores encontrados variaram entre 4,71 mg/L a 437,43 mg/L para os vinagres de vinho tinto. A presença de vinagres de vinho com concentrações tão baixas de acetoína pode indicar a existência de fraudes, tal como a diluição de vinagres de vinho com outros tipos de vinagres que não apresentem teores consideráveis de acetoína.

Contrariamente aos resultados obtidos para o vinagre de álcool produzido em laboratório, as amostras comerciais de vinagres de álcool apresentaram teores de acetoína variando entre 0 e 21,90 mg/L. Essas concentrações podem ser consideradas muito baixas quando em comparação com os vinagres de vinho, nos quais os teores de acetoína podem chegar a 1 g/L.

Comprova-se assim, que a análise do teor de acetoína em vinagres, por cromatografia gasosa, é uma metodologia prática e viável e, quando associada às análises físico-químicas já comumente realizadas nestes produtos, é um complemento

eficaz para assegurar a genuinidade dos vinagres nacionais podendo ser considerada superior aos parâmetros atuais estabelecidos pela legislação brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, J.C. **Produção de diacetil e acetoína: Desenvolvimento de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovari. *diacetylactis***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química e de Alimentos, UFSC, 1999, 100 p.
- ESCRITÓRIO INTERNACIONAL DA VINHA E DO VINHO. **Projets de Resolutions – Determination de la teneur en acetoïne**. 80ème Assemblee Generale, OENO, Paris, 2000
- GERBI, V., ZEPPA, G., ANTONELLI, A., NATALI, N. & CARNACINI, A. **Evoluzione dei Costituenti Principali del Vino e del Sidro nel Corso dell'Acetificazione**. Industrie delle Bevande, XXIV, p. 241 – 246, 1995.
- GIL DE LA PEÑA, M.L., GARRIDO, M.D. & LLAGUNO, C. **Aportación al estudio de los vinagres españoles. II. Contenido en C¹⁴**. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 16 (3), p. 413 – 418, 1976.
- LEWIS, J., TODD, B & STANLEY, G. **Determination of diacetyl in wines**. The Australian Grapegrower & Winemaker, 398, p. 12 – 15, 1997.

LLAGUNO, C. **Quality of Spanish Wine Vinegars**. *Process Biochemistry*, 12(8), p. 17 – 19, 44, 46, 1977.

LLAGUNO, C., POLO, M.C. **El Vinagre de Vino**. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 1991. 238 p.

MECCA, F., ANDREOTTI, R. VERONELLI, L.. **L'Aceto**. Brescia: Edizione AEB, 1979. 433 p.

MORITZ, D. E. **Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aroma**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, UFSC, 1998, 111 p.

PALACIOS, A.T., VILA, J., CALDERÓN, F. CALLEJO, M. J., COLOMO, B. y SUÁREZ, J.A. **Fraccion Aromatica de Vinos Tintos com Crianza Biologica**. *Alimentaria*, Julio – Agosto, p. 67 – 69, 1995.

de REVEL, G. P. **Le Diacetyle, les Composes Dicarbonyles el Leurs Produits de Reduction Dans le Vin**. Thèse de Doctorat. Universite de Bordeaux II, France, 1992, 171 p.

ROMANO, P. & SUZZI, G. **Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation**. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, p. 309 – 315, 1996.

ROMANO, P., SUZZI, G., BRANDOLINI, V., MENZIANI, E & DOMIZIO, P. **Determination of 2,3-butanediol in high and low acetoin producers of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts by automated multiple development (AMD)**. *Letters in Applied Microbiology*, 22, p. 299 – 302, 1996.

- ROMANO, P., SUZZI, G., MORTIMER, R. & POLSINELLI, M. **Production of high levels of acetoin in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts is a recessive trait.** Journal of Applied Bacteriology, 78, p. 169 – 174, 1995.
- ROMANO, P., SUZZI, G., TURBANTI, L. & POLSINELLI, M. **Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts.** FEMS Microbiology Letters, 118. p. 213 – 218, 1994.
- TEIXEIRA, R. M. **Otimização das Condições de Cultura para Produção de Acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química e de Alimentos, UFSC, 1999, 109 p.
- TRONCOSO GONZÁLES, A.M. & GUZMÁN CHOZAS, M. **Acetoin Content of Andalusian Vinegars.** Sciences des Aliments, 7, nº 3, p. 499 – 505, 1987.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os objetivos propostos pelo estudo foram satisfatoriamente atingidos. Os vinagres produzidos em escala laboratorial apresentaram características físico-químicas e sensoriais similares aos vinagres produzidos industrialmente, o que os tornou aptos a serem comparados com os vinagres produzidos industrialmente. Essa comparação objetivava estudar e estabelecer relações entre as características dos vinagres e sua procedência.

Através do acompanhamento e avaliação das características dos vinagres durante seu processo de acetificação biológica, tanto para os vinagres de vinho como para os vinagres de álcool, foi possível a constatação de que vinagres procedentes de vinho tinto apresentam maiores teores de extrato seco e cinzas do que os vinagres obtidos a partir de vinho branco. Os valores de extrato seco encontrados para os vinagres de vinho chegaram a ser o dobro que o mínimo estabelecido pela legislação em vigor.

O vinagre obtido a partir de álcool apresenta teores de extrato seco e cinzas bem mais baixos do que os vinagres de vinho produzidos experimentalmente.

Através das análises físico-químicas das amostras comerciais, conclui-se que os vinagres de vinho nacionais apresentam uma falta de padronização em suas características físico-químicas.

As amostras de vinagres de vinho tinto nacionais analisadas foram as que apresentaram maior diferença nos resultados de suas análises físico-químicas. A falta de uniformidade das amostras comerciais analisadas ficou evidenciada pelos resultados encontrados para o teor de extrato seco: o menor valor foi de 7,14 g/L e o maior valor, 115,32 g/L. Os valores para acidez volátil também apresentaram grande variação indicando inclusive a existência de amostras com valores inferiores ao valor mínimo legal.

As amostras de vinagres de vinho branco comerciais analisadas apresentaram maior uniformidade em suas características físico-químicas do que os vinagres de vinho tinto, embora os valores de extrato seco para essas amostras sejam inferiores aos valores encontrados para o vinagres de vinho branco produzido e para a amostra de vinagre de vinho branco italiano.

As amostras de vinagres de álcool analisadas mostraram que esse tipo de vinagre apresenta teores de extrato seco e cinzas bem menores do que os vinagres de vinho e também não uniformes. As características encontradas para essas amostras foram bastante similares aos resultados para o vinagre de álcool produzido experimentalmente.

Outro objetivo satisfatoriamente atingido foi a busca de uma relação entre as concentrações de acetoína nos vinagres e sua matéria-prima de origem a fim de verificar sua genuinidade. Comprovou-se que somente em vinagres obtidos a partir de vinhos existem teores consideráveis de acetoína. Para o vinagre de vinho tinto, as concentrações de acetoína ficaram em torno de 700 mg/L. Nos vinagres de vinho branco as concentrações ficaram em torno de 160 mg/L. O vinagre fabricado a partir de soluções diluídas de álcool não apresentou presença de acetoína detectável em sua composição.

As amostras de vinagres de vinho nacionais analisadas mostraram grande variação na concentração de acetoína em suas composições. Os teores encontrados variaram entre 4,71 mg/L a 437,43 mg/L para os vinagres de vinho tinto. Os resultados para as amostras de vinagres de álcool foram muito baixos; os teores de acetoína variaram entre 0 e 21,90 mg/L.

Constata-se que a determinação cromatográfica do teor de acetoína em vinagres é uma análise eficaz para comprovar a genuinidade dos vinagres de vinho nacionais, principalmente quando associada às análises físico-químicas básicas.

A realização deste trabalho permite ainda concluir que a legislação vigente é insuficiente para a especificação de vinagres de alta qualidade, sendo a determinação do teor de acetoína por cromatografia gasosa, uma contribuição eficaz à melhoria do controle da qualidade e genuinidade dos vinagres de vinho nacionais e até mesmo, para a legislação do MERCOSUL.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se afirmar que a impressão final ao término deste estudo sobre os vinagres nacionais reafirma a necessidade de maiores pesquisas e esclarecimentos ao consumidor sobre as características desses produtos.

Os resultados evidenciaram que os vinagres de álcool apresentam realmente características inerentes a sua matéria-prima e forma de obtenção. Já os vinagres de vinho, tanto tinto como branco, não mostraram esse mesmo comportamento. Muitas características, mesmo que atendam à legislação vigente, não representam aquelas esperadas desses produtos, o que reforça as suspeitas de que parte dos vinagres de vinho nacionais sejam adulterados.

Essa adulteração não interessa ao consumidor e nem aos produtores sérios de vinagres de vinho. Estima-se que o consumo anual de vinagre no país seja de cerca de 150 milhões de litros (segundo dados informais da ANAVI – Associação Nacional dos Produtores de Vinagre). Este volume indica a importância deste produto para o setor vitivinícola nacional pois logo após o consumo do vinho e da uva *in natura*, trata-se da maior demanda destes produtos.

Os poucos parâmetros exigidos legalmente, muitas vezes com valores muito amplos ou indefinidos e a falta de fiscalização rigorosa sobre fabricantes e produtos também facilitam a adulteração dos vinagres de vinho nacionais.

Na realidade econômica mundial atual não há espaço para produtos sem qualidade. As tendências mostram um quadro onde somente bons produtos suportarão e sobreviverão à concorrência numa economia globalizada. Mesmo que não haja pretensões de se ganhar outros mercados, como o do Mercosul por exemplo, é necessário pelo menos defender o próprio mercado, o nacional.

A partir deste estudo, pode-se afirmar que é necessário estabelecer parâmetros e valores mais rígidos, assim como uma fiscalização mais abrangente para os vinagres nacionais, de forma a qualificar este produto frente a concorrência e em respeito a todos os consumidores deste país.

Coloca-se aqui, como sugestão, a inclusão da análise do teor de acetoína para vinagres de vinho, tinto e branco, e a fixação de um valor mínimo de 100 mg/L de acetoína nestes produtos. Justifica-se este valor, mais alto do que o estabelecido pela legislação

espanhola, para evitar fraudes como a exemplificada anteriormente. Vale ainda ressaltar que as legislações européias podem estabelecer valores menores para o teor de acetoína pois, além deste, diversos outros parâmetros indicadores da qualidade dos vinagres são exigidos. Por exemplo, relações entre a acidez volátil, teores de cinza e extrato seco.

Outro ponto que merece maiores estudos são os baixos limites estabelecidos para os teores de extrato seco mínimos exigidos pela legislação brasileira. Acredita-se que a elevação desses limites, juntamente com a análise de acetoína preveniriam muitas ações fraudulentas com os vinagres nacionais.

Independentemente de modificações na legislação, a busca de qualidade para os produtos nacionais sempre justifica maiores pesquisas nesta área já que inexistem dados sobre os vinagres brasileiros genuínos para qualquer comparação ou análise mais profunda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUARONE, E., LIMA, U. A., BORZANI, W. 1983. *Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação*. São Paulo, Editora Edgard Blücher, 243 p.
- BASSIT, N.; BOQUIEN, C.; PICQUE, D. & CORRIEU, G. 1993. *Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*. Applied and Environmental Microbiology, 59 (6), p. 1893 – 1897. Em: TEIXEIRA, R. M. *Otimização das Condições de Cultura para Produção de Acetoína por Hanseniaspora quilliermondii*. 1999. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 109 p.
- BRASIL. 1974. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Inspeção de Produto Vegetal. *Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Cerveja, Vinho, Vinho de Frutas, Fermentado de Cana, Saquê, Filtrado Doce, Hidromel, Jeropiga, Mistela, Sidra, Vinagre*. Brasília: Imprensa Nacional, 109 p.
- BRASIL. 1986. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Metodologia de Análise de Bebidas e Vinagres*. Brasília: Imprensa Nacional, 67 p.
- BRASIL. 1988. *Lei No. 7.678 de 08 de Novembro de 1988*. Brasília: Imprensa Nacional.
- BRASIL. 1990. *Decreto nº 99.066 de 08 de Março de 1990*. Brasília: Imprensa Nacional.
- CARBONELL, M. 1970. *Tratado de Vinicultura*. Barcelona, Editorial Aedos, 242 p.
- CARVALHO, J.C. 1999. *Produção de diacetil e acetoína: Desenvolvimento de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de Lactococcus lactis subsp. lactis biovari. diacetylactis*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 100 p.
- COLLINS, E.B. 1972. *Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms*. J. Dairy Sci. 55, p. 1022 – 1028. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. 1996. *Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation*. Applied and Environmental Microbiology, 62, p. 309 – 315.
- GERBI, V., ZEPPA, G., ANTONELLI, A., NATALI, N. & CARNACINI, A. 1995. *Evoluzione dei Costituenti Principali del Vino e del Sidro nel Corso dell'Acetificazione*. Industrie delle Bevande, XXIV, p. 241 – 246.

- GIL DE LA PEÑA, M.L., GARRIDO, M.D. & LLAGUNO, C. 1976. **Aportación al estudio de los vinagres españoles. II. Contenido en C¹⁴**. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 16 (3), p. 413 – 418.
- LEWIS, J., TODD, B & STANLEY, G. 1997. **Determination of diacetyl in wines**. The Australian Grapegrower & Winemaker, 398, p. 12 – 15.
- LLAGUNO, C. 1977. **Quality of Spanish Wine Vinegars**. Process Biochemistry, 12(8), p. 17 – 19, 44, 46.
- LLAGUNO, C., POLO, M.C. 1991. **El Vinagre de Vino**. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 238 p.
- LLAGUNO, C. 1971. **Spanish Wine Vinegar**. Process Biochemistry. 6(5), p. 27-28 & 33.
- MECCA, F., ANDREOTTI, R. VERONELLI, L. 1979. **L'Aceto**. Brescia: Edizione AEB, 433 p.
- MORITZ, D. E. 1998. **Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aroma**. Tese de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 111 p.
- NAKAYAMA, T. (1961). **Studies on Acetic Acid Bacteria. IV. Purification and properties of a new type of alcohol dehydrogenate, alcohol-cytochrome 553 reductase**. J. Biochem., 49, 24. Em: LLAGUNO, C., POLO, M.C. 1991. **El Vinagre de Vino**. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 238 p.
- PALACIOS, A.T., VILA, J., CALDERÓN, F. CALLEJO, M. J., COLOMO, B. y SUÁREZ, J.A. 1995. **Fraccion Aromatica de Vinos Tintos com Crianza Biologica**. Alimentaria, Julio – Agosto, p. 67 – 69.
- POLO, M. C., SUÁREZ, M. A. & LLAGUNO, C. 1976. Aportación al estudio de los vinagres españoles. I. Contenido en aminoácidos libres y nitrógeno total. ATA, 16(2), p. 257 – 264.
- de REVEL, G. P. 1992. **Le Diacetyle, les Composes Dicarbonyles et Leurs Produits de Reduction Dans le Vin**. Thèse de Docteur. Université de Bordeaux II, France, 171 p.
- RIZZON, L. A. & MIELE, A. 1998. **Características Analíticas de Vinagres Comerciais de Vinhos Brasileiros**. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, 1(1,2), p. 25-31.
- ROMANO, P. & SUZZI, G. 1996. **Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation**. Applied and Environmental Microbiology, 62, p. 309 – 315.
- ROMANO, P., SUZZI, G., BRANDOLINI, V., MENZIANI, E & DOMIZIO, P. 1996. **Determination of 2,3-butanediol in high and low acetoin producers of**

- Saccharomyces cerevisiae wine yeasts by automated multiple development (AMD).***
Letters in Applied Microbiology, 22, p. 299 – 302.
- ROMANO, P., SUZZI, G., MORTIMER, R. & POLSINELLI, M. 1995. ***Production of high levels of acetoin in Saccharomyces cerevisiae wine yeasts is a recessive trait.*** Journal of Applied Bacteriology, 78, p. 169 – 174.
- ROMANO, P., SUZZI, G., TURBANTI, L. & POLSINELLI, M. 1994. ***Acetaldehyde production in Saccharomyces cerevisiae wine yeasts.*** FEMS Microbiology Letters, 118, p. 213 – 218.
- SHIMAZU, Y., UEHARA, M. & WATANABE, M. 1985. ***Transformation of Citric Acid to Acetic Acid, Acetoin and Diacetyl by Wine Making Lactic Acid Bacteria.*** Agric. Biol. Chem., 49 (7), p. 2147 – 2157.
- SHINOHARA, T., SHIMAZU, Y. & WATANABE, M. 1979. ***Dosage de l'Acétoïne et du Lactate d'Éthyle dans les Vins par Chromatographie en Phase Gazeuse, et Étude de Leur Formation dans les Vins.*** Agric. Biol. Chem., 43 (12), p. 2569 – 2577.
- TEIXEIRA, R. M. 1999. ***Otimização das Condições de Cultura para Produção de Acetoína por Hanseniaspora guilliermondii.*** Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 109 p.
- TRONCOSO GONZÁLES, A.M. & GUZMÁN CHOZAS, M. 1987. ***Acetoin Content of Andalusian Vinegars.*** Sciences des Aliments, 7, nº 3, p. 499 – 505.
- WAINWRIGHT, T. 1973. ***Diacetyl – a review. I. Analytical and biochemical considerations. II Brewing experience.*** J. Inst. Brew. 79, p. 451 – 470. Em: ROMANO, P. & SUZZI, G. 1996. ***Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation.*** Applied and Environmental Microbiology, 62, p. 309 – 315.

ANEXOS

ANEXO I

COMPOSIÇÃO DO VINAGRE – ALGUNS ITENS PROPOSTOS PELO CODEX ALIMENTARIUS

✓ *Acidez total*

Vinagre de vinho, não menos de 6 g de ácido acético / 100 ml (6° acéticos).

Outros vinagres, não menos de 5 g de ácido acético / 100 ml (5° acéticos).

✓ *Álcool residual*

O álcool de fermentação que resta sem sofrer acetificação nos vinagres não deve ultrapassar de 0,5%, ainda que para o vinagre de vinho se admita 1% (1° alcoólico).

✓ *Extrato seco*

O valor do extrato seco no vinagre de vinho não deve ser menor de 1,3 g/L por grau acético. Em outros tipos de vinagre não deve ser menor de 2 g/L por grau acético.

✓ *Conservadores*

O conservador universalmente permitido em vinagres é o SO₂, ainda que o *Codex Alimentarius* também tenha proposto o antioxidante ácido ascórbico. A concentração máxima de SO₂ admitida é de 70 mg/Kg e de ácido ascórbico de 400 mg/Kg.

✓ *Aditivos*

Corante caramelo segundo as práticas comumente admitidas.

✓ *Contaminantes metálicos*

Conteúdo de arsênio, máximo 1 mg/Kg.

Conteúdo de chumbo, máximo 1 mg/Kg.

Total dos conteúdos de cobre e zinco, máximo 10 mg/Kg.

✓ *Higiene*

O vinagre deve estar livre de microrganismos que possam se desenvolver nas condições normais de armazenamento do produto, em quantidades que representem riscos para a saúde do consumidor.

O vinagre para consumo não pode conter enguias ou qualquer substância, em suspensão ou formando depósitos. Também não se admite turbidez devido ao desenvolvimento de bactérias acéticas (mãe do vinagre).

ANEXO II

PARTE DO DECRETO N.º 99.066 DE 08 DE MARÇO DE 1990.

Regulamenta a Lei n.º 7.678, de 08 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva.

Capítulo IV

DOS PADRÕES DE IDENTIDADE E QUALIDADE

Seção VIII

Do vinagre

Art. 97. O vinho destinado à elaboração do vinagre deverá ser acetificado na origem, com vinagre duplo, de modo que apresente após a acetificação, uma acidez acética mínima de seis milésimos, expressa em gramas de ácido acético, em cem mililitros de vinho.

Art. 98. O vinagre duplo deverá ter uma acidez volátil mínima de oito gramas em cem mililitros do produto, expressa em ácido acético, e apresentar estabilidade biológica.

Art. 99. Somente será considerado matéria-prima, para elaboração de vinagre, o vinho-base que atender ao disposto no art. 97.

Art. 100. A fiscalização deverá executar a análise prévia e a expedição da Guia de Livre Trânsito para o vinagre destinado à acetificação do vinho.

Art. 101. Os fornecedores de vinho destinado à elaboração de vinagre providenciarão a aquisição do vinagre duplo para acetificá-lo até o limite mínimo previsto no art. 97 e o estocará em tanque próprio, em prédio isolado, distante da adega.

Art. 102. A operação de acetificação do vinho-base deverá ser feita no próprio recipiente que fará seu transporte até o destino e no local previsto no artigo precedente, com utilização de equipamento específico (bombas, mangueiras, filtros, etc.) para tal fim.

Art. 103. A acidez volátil mínima do vinagre será de quatro gramas em cem mililitros do produto, expressa em ácido acético, e o álcool residual não deverá exceder a 1ºGL, sendo os outros componentes proporcionais à matéria-prima usada em sua elaboração e previstos pelo Ministério da Agricultura.

Parágrafo único. O vinagre que contiver acidez volátil superior ao dobro do previsto neste artigo, será denominado vinagre duplo, podendo ser desdobrado para fins de comercialização.

Art. 104. Ao vinagre não poderá ser adicionado caramelo ou outro tipo de corante.

Art. 105. Será proibido o uso de melaço, subproduto do açúcar, mesmo como nutriente, na elaboração do vinagre.

Art. 106. O vinagre poderá ser submetido à filtração, colagem, clarificação, aeração e envelhecimento.

Art. 107. A conservação do vinagre poderá ser feita mediante pasteurização ou pelo uso de dióxido de enxofre, na quantidade máxima prevista pelo Ministério da Agricultura.

Art. 108. O uso de outro tipo de conservante, aditivo ou nutriente só poderá ocorrer mediante prévia autorização do órgão competente.

Art. 109. O grau de acidez deverá constar no rótulo ou, no caso de transporte a granel, no respectivo documento fiscal.

Art. 110. O vinagre será classificado em vinagre de vinho tinto ou vinagre de vinho branco, de acordo com a matéria-prima que lhe deu origem.

Art. 111. O produto resultante da fermentação acética de outros líquidos alcoólicos será denominado de fermentado acético.

Parágrafo único. O fermentado acético de outros líquidos alcoólicos poderá usar a palavra "vinagre" no rótulo, porém acrescida do nome da matéria-prima de sua origem, em caracteres de dimensão e cor iguais ao da palavra "vinagre" de maior dimensão.

Art. 112. O ácido acético do vinagre somente poderá provir da fermentação acética do vinho.

Art. 113. É vedada a produção de vinagre artificial para uso alimentar.

Art. 114. A avaliação físico-química e organoléptica ou sensorial dos vinhos e derivados, para fins de concurso ou competição pública, com divulgação ou sem ela, deverá contar com a prévia e expressa autorização dos produtores eventualmente interessados em participar, sendo obrigatória a supervisão pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, por intermédio do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho – CNPUV, que fixará as normas e métodos a serem empregados.

COMPLEMENTAÇÃO DOS PADRÕES DE IDENTIDADE E QUALIDADE PARA FERMENTADOS ACÉTICOS (VINAGRES)

Documento oficializado pela Portaria n.º 371, publicada no D.O.U. de 19/09/74 e modificado (itens 2.2 e 5.1) pela Portaria n.º 745 publicada no D.O.U. de 17.11.77

1. OBJETO

1.1 Os presentes padrões têm por objeto estabelecer as normas de identidade e qualidade a que deverão obedecer os fermentados acéticos (vinagres).

2. DESCRIÇÃO

2.1 Definição

Fermentado acético (vinagres) é o produto obtido da fermentação acética de líquidos alcoólicos.

2.2 Classes de fermentados acéticos (vinagre)

De acordo com a matéria-prima que lhe deu origem os fermentados acéticos são classificados em:

- Vinagre de vinho ou simplesmente "vinagre"
- Vinagre de frutas
- Vinagre de álcool

2.3 Designação

2.3.1 Os vinagres serão designados conforme as respectivas classes.

2.3.1.1 Vinagre de vinho ou simplesmente "vinagre" é o produto obtido da fermentação acética do vinho.

2.3.1.2 Vinagre de fruta é o produto obtido da fermentação acética do fermentado de frutas.

2.3.1.3 Vinagre de álcool é o produto obtido da fermentação acética de uma mistura hidroalcoólica.

2.3.2 Denomina-se “concentrado duplo” ao fermentado acético cuja acidez volátil for igual ou superior a 8 g (oito gramas) por 100 ml (cem mililitros), e inferior a 12 g (doze gramas) por 100 ml (cem mililitros), expresso em ácido acético.

2.3.3 Denomina-se “concentrado triplo” ao fermentado acético cuja acidez volátil for igual ou superior a 12 g (doze gramas) por 100 (cem mililitros) expresso em ácido acético. A produção deste tipo somente será permitida quando a matéria-prima for o álcool.

3. INGREDIENTES BÁSICOS

3.1 O fermentado acético deverá ser preparado de mosto limpo, isento de matéria terrosa e de detritos animais ou vegetais.

4. INGREDIENTES OPCIONAIS

4.1 Na elaboração de fermentados acéticos será permitida a adição de sais nutrientes e açúcares para o desenvolvimento do fermento.

4.2 Na elaboração de vinagre de álcool é permitida a utilização de aminoácidos, vitaminas e melação, na quantidade mínima necessária à complementação do substrato de fermentação acética.

5. COMPOSIÇÃO

5.1 Os vinagres de vinho e os vinagres de frutas, deverão apresentar:

	Máximo – Mínimo	
Acidez volátil, em ácido acético, em g/100 ml.	-	4,0
Álcool em volume a 20° (G.L.)	1,0	-
Cinzas em g/l	-	1,0
Extrato seco reduzido em g/l: tintos e rosados	-	7,0
brancos	-	6,0
Sulfatos de potássio em g/l	1,0	-

5.2 Os vinagres de álcool deverão apresentar:

	Máximo – Mínimo	
Acidez volátil, em ácido acético, em g/100 ml.	-	4,0
Álcool em volume a 20° G.L.	1,0	-

5.3 para os “vinagres concentrados” vigorarão as mesmas características e constantes analíticas exigidas para o vinagre simples, obedecidas as proporções da concentração.

6. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

6.1 Os fermentados acéticos deverão apresentar as características organolépticas seguintes:

Aspecto: líquido, límpido e sem depósito

Cor: de acordo com a matéria-prima que lhe deu origem

Cheiro: característico

Sabor: ácido

6.2 O fermentado acético poderá ser submetido a filtração, colagem, clarificação, aeração, descoramento pelo carvão ativo e envelhecimento.

7. PESOS E MEDIDAS

7.1 Será obedecida a legislação federal específica em vigor.

8. ROTULAGEM

8.1 Deverá ser obedecidas as normas estabelecidas pelo Decreto n.º 73.267, de 06 de dezembro de 1973 e a legislação complementar.

8.2 O vinagre resultante da fermentação acética de outros líquidos alcoólicos deverá ter no rótulo a denominação vinagre, acrescida do nome da matéria-prima que lhe deu origem, em caracteres gráficos de dimensão e cor igual a palavra vinagre.

9. AMOSTRAGEM E MÉTODOS DE ANÁLISES

9.1 Os métodos oficiais de amostragem são aqueles estabelecidos no artigo 22 e seus parágrafos do Decreto n.º 73.267, de 06 de dezembro de 1973.

9.2 Os métodos oficiais de análises serão aqueles estabelecidos em Atos Administrativos do Ministério de Agricultura.

10. DISPOSIÇÕES GERAIS

10.1 Os casos omissos serão resolvidos por Atos Administrativos do Ministério da Agricultura.

ANEXO III

PROJETO DE RESOLUÇÃO DA COMISSÃO DE ENOLOGIA DO ESCRITÓRIO INTERNACIONAL DA VINHA E DO VINHO – OENO/SCMA/96/41/18/Et.7

XVIII. VINAGRES DE VINHO – DETERMINAÇÃO DO TEOR EM ACETOÍNA

1. Introdução

A acetoína ($\text{CH}_3\text{COCHOHCH}_3$) é um constituinte sempre presente nos vinhos e nos vinagres. Segundo a bibliografia, seu teor é, nos vinhos, da ordem de 10 mg/L. Nos vinagres, os teores podem variar, segundo a tecnologia empregada, entre menos de 100 mg/L e mais de 400 mg/L.

O teor de acetoína dos vinagres de vinho pode constituir uma importante referência de sua qualidade e um parâmetro indicador de sua origem.

2. Princípio

Neutralização da amostra à pH 7,00 com hidróxido de cálcio. Determinação direta da acetoína por cromatografia em fase gasosa.

3. Reagentes

3.1 Acetoína purificada. Eliminar a presença eventual de diacetil, por destilação.

3.2 Soluções de referência de acetoína

Por diluição de acetoína (3.1) com água, preparar as soluções de referência de acetoína de 10 à 500 mg/L.

3.3 Pentanol-1 (padrão interno).

3.4 Etanol.

3.5 Solução do padrão interno.

Em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver 2 mL de pentanol-1 em uma solução hidroalcoólica a 50%. Aferir o volume com a solução hidroalcoólica.

3.6 Hidróxido de cálcio.

4. Aparelhos e utensílios

Material de laboratório de uso corrente, e também:

4.1 Cromatógrafo em fase gasosa com detetor de ionização de chama.

4.2 Coluna de cromatografia em fase gasosa de 2 m de comprimento e 1/8 de polegada de diâmetro: FFAP 2,5% sobre Chromosorb G (HP), 0,5% de Carbowax 1500 (ou todo outro sistema capaz de efetuar uma boa separação de acetoína).

5. Técnica

Usar uma quantidade da solução de padrão interno (3.5) nas soluções de referência de acetoína (3.2), de forma que as soluções contenham, por L, 15 ou 35 μL de pentanol-1 (depende se os teores de acetoína são, respectivamente, inferior ou superior a 50 mg/L).

Neutralizar a amostra à $\text{pH} \cong 7,00$, usando o hidróxido de cálcio (sólido). Usar uma quantidade da solução de padrão interno (3.5), para que a solução obtida contenha, por L, 15 ou 35 μL de pentanol-1 (em função do teor de acetoína).

No cromatógrafo, injetar 2 μL da amostra neutralizada e das soluções de referência, adicionadas do padrão interno. A temperatura do forno é de 70°C e o fluxo do gás vetor (nitrogênio) é de 12,5 mL/min. A temperatura do detetor é de 180°C .

6. Resultados

6.1 Cálculo

Seja:

A_i a superfície do pico de acetoína na solução de referência i;

P_i a superfície do pico de pentanol-1 na solução de referência i;

A_x a superfície do pico de acetoína na solução a dosar;

P_x a superfície do pico de pentanol-1 na solução a dosar.

Determinar, pelas diferentes soluções de referência, as relações A_i / P_i .

Expressar graficamente essas relações em função do teor de acetoína das soluções de referência, obtendo duas curvas (0 à 50 mg/L e 50 à 500 mg/L).

O teor de acetoína da amostra, expressa em mg/L, é obtida graficamente com a relação A_x / P_x .

6.2 Apresentação

Arredondar os resultados encontrados em mg/L a unidade.

7. Bibliografia

Anônimo, *Métodos Oficiales de Análisis*, Tomo II, Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid (1993).

Gorostiza, E., Gil de la Peña, M. & Cordobés, M., *La Semana Vitivinícola: 1577 – 1578* (1976).

Llaguno, C. & Polo, M.C., *El Vinagre de Vino*, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (1991).

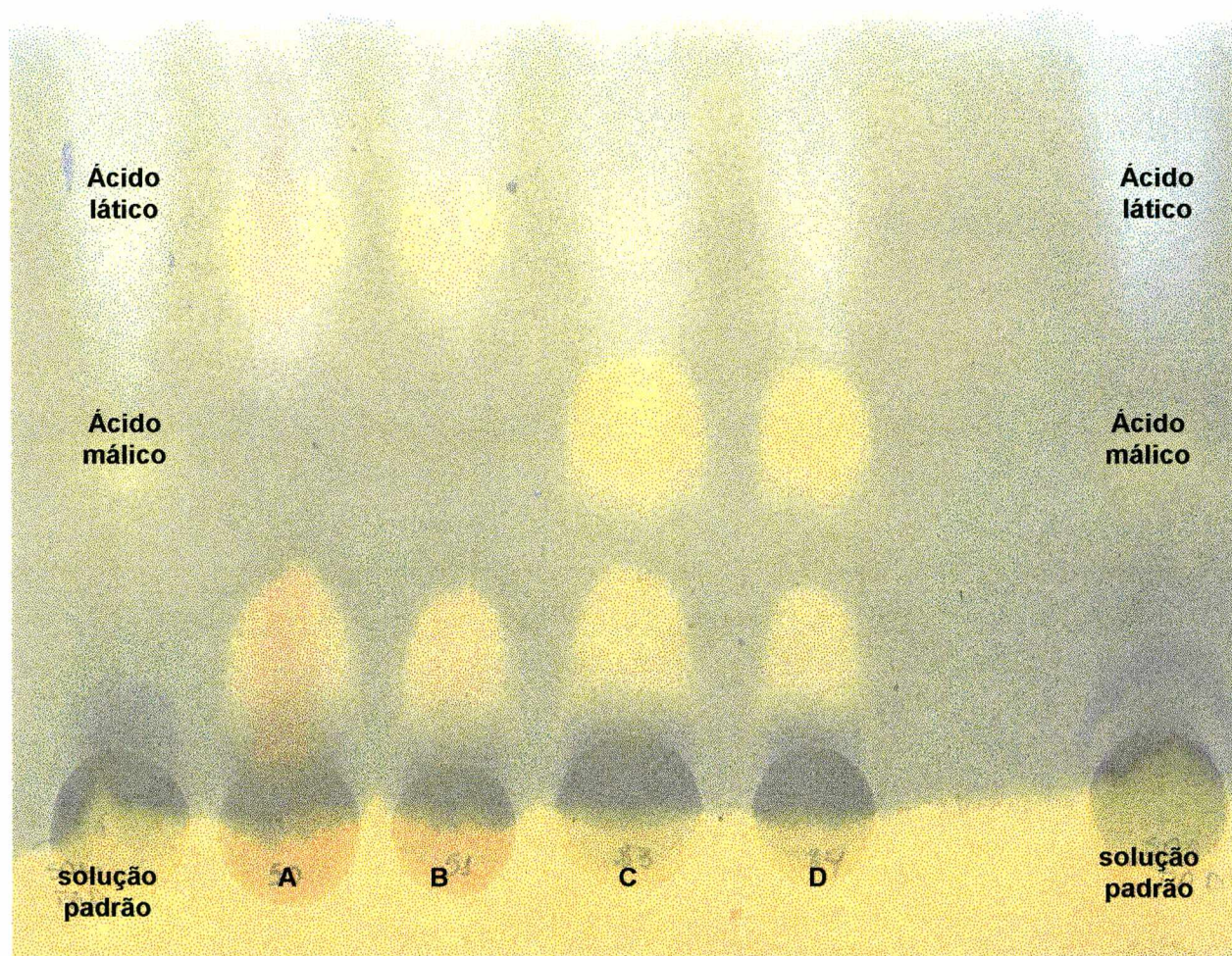
ANEXO IV

CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA OS VINHOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DOS VINAGRES

1. Resultados obtidos por análise em cromatografia líquida

Ácido orgânico	Vinho branco – variedade <i>Villenave</i>	Vinho tinto – variedade <i>Isabel</i>
- ácido tartárico (g/L)	2,91	3,67
- ácido málico (g/L)	12,88	0,56
- ácido láctico (g/L)	2,57	3,41
- ácido acético (g/L)	9,62	1,82
- ácido cítrico (g/L)	0,14	0,44

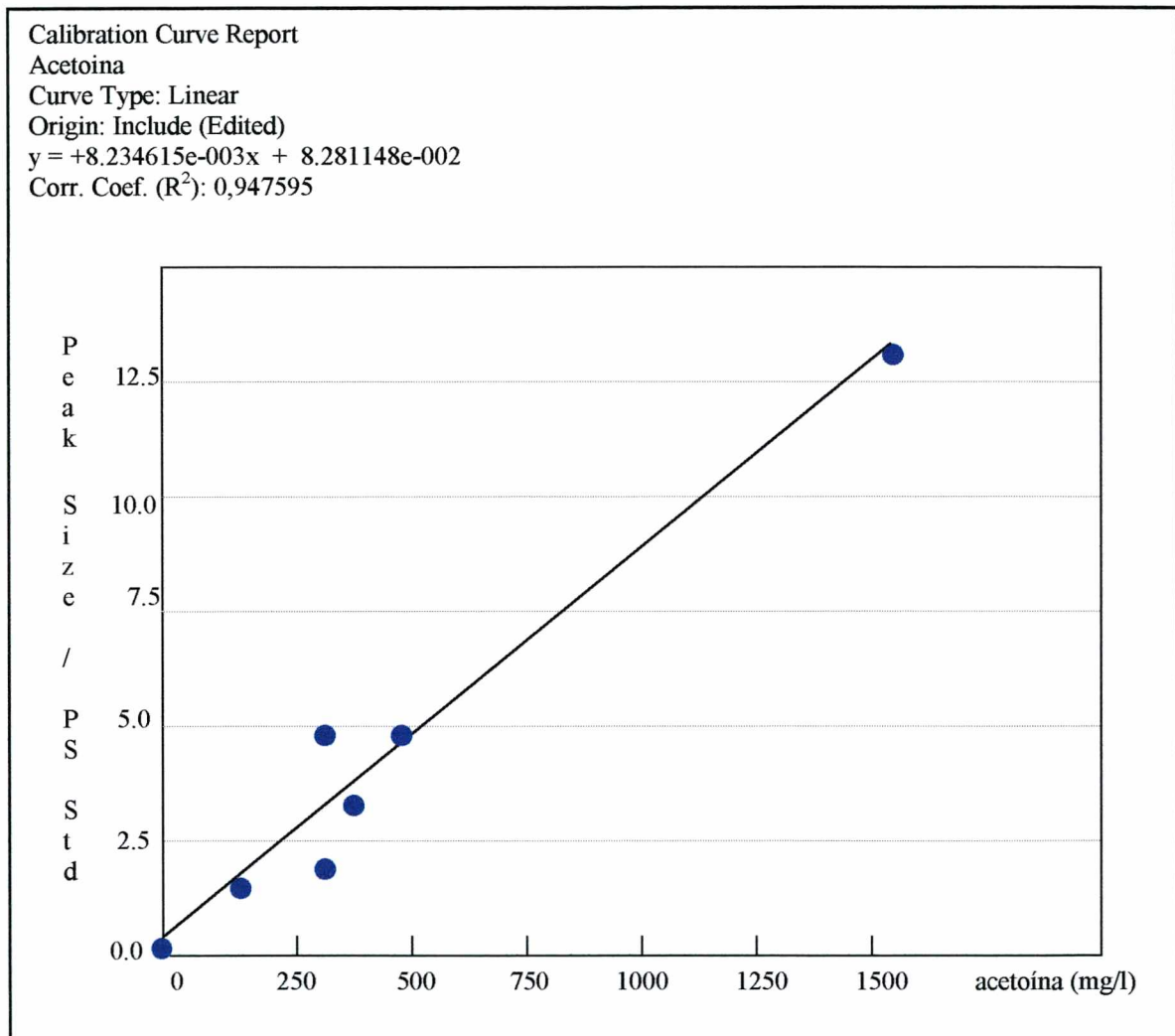
2. Cromatografia em papel dos vinhos



Amostras: A – Vinho tinto; B – Vinho tinto; C – Vinho branco; D – Vinho branco

ANEXO V

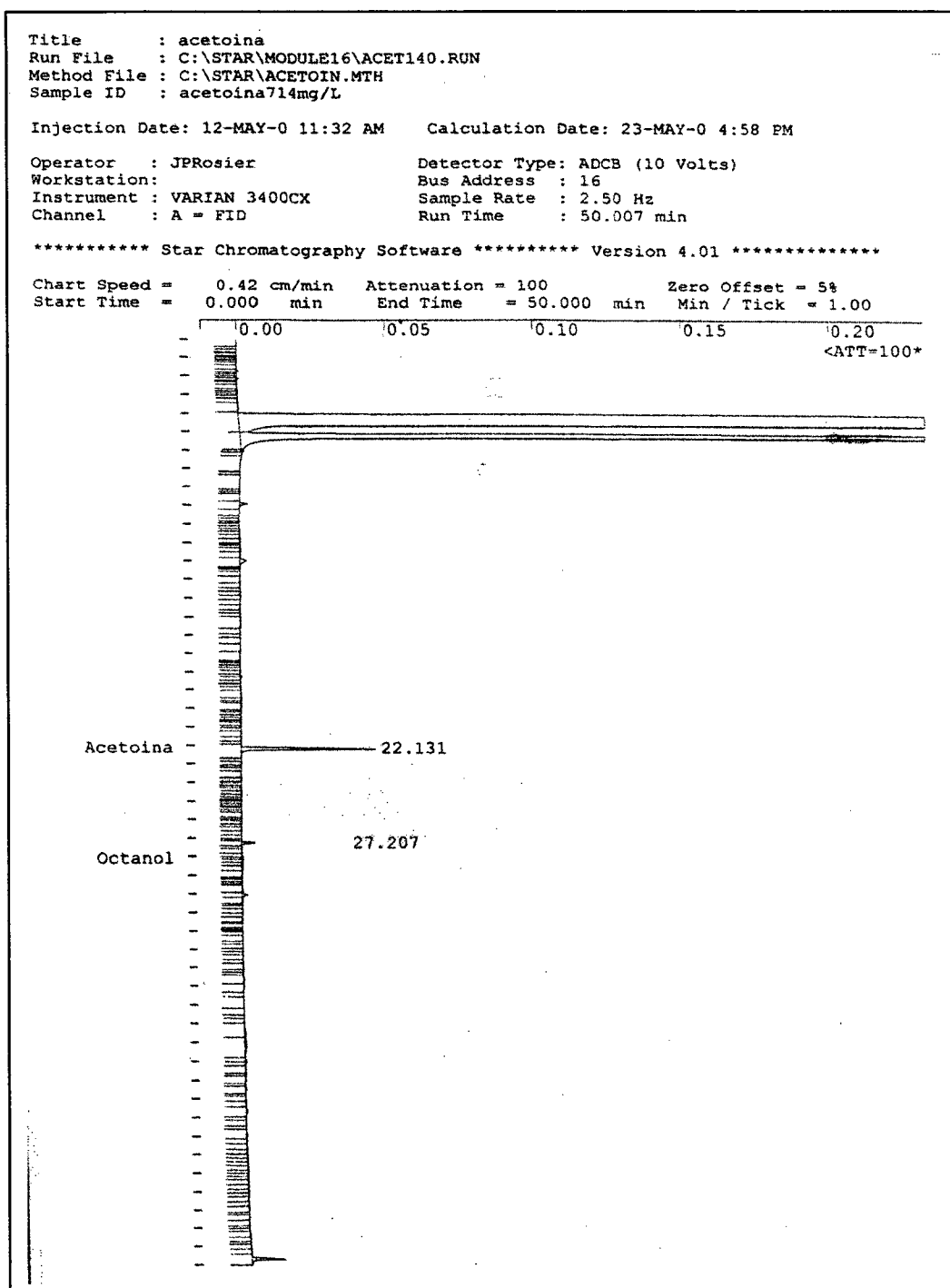
CURVA PADRÃO UTILIZADA PARA AS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DE ACETOÍNA



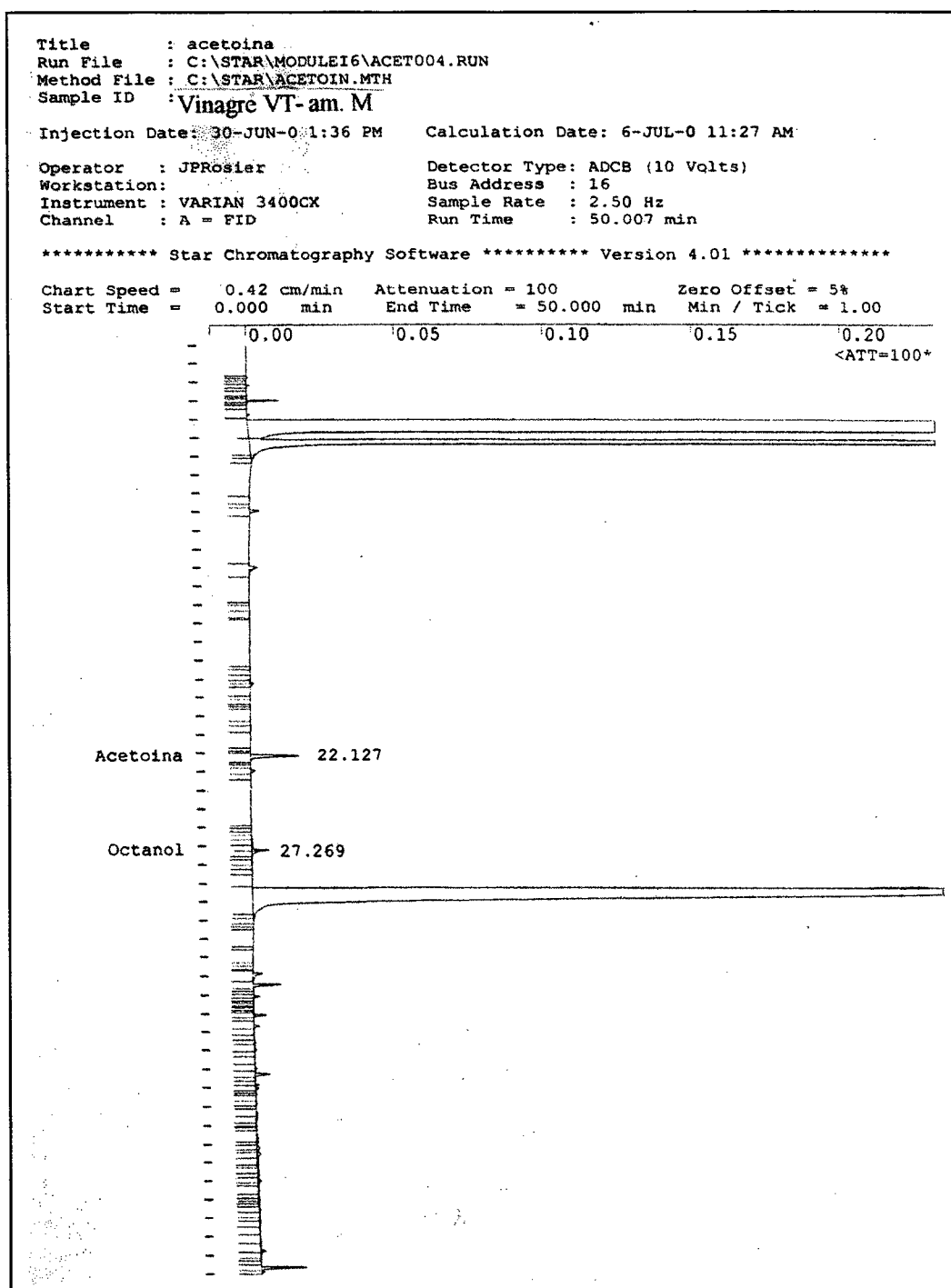
ANEXO VI

CROMATOGRAMAS DA ANÁLISE DE ACETOÍNA

1. CROMATOGRAMA DE SOLUÇÃO DE ACETOÍNA (USADA PARA DETERMINAÇÃO DA CURVA PADRÃO)



3. CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE VINAGRE DE VINHO TINTO – M



ANEXO VII

TEORES DE ACETOÍNA NOS VINAGRES PRODUZIDOS

Tabela Anexo VII – Teores de acetoína nos vinagres produzidos

Estágio de fabricação	Teor de acetoína (mg/L)		
	Vinagre de vinho tinto	Vinagre de vinho branco	Vinagre de álcool
- calda inicial	78,94	12,00	0,00
- 1ª remontagem	225,79	58,50	0,00
- 2ª remontagem	560,53	97,76	0,00
- 3ª remontagem	336,46	97,69	0,00
- 4ª remontagem	402,43	94,00	0,00
- 5ª remontagem	556,48	66,34	0,00
- 1ª retirada	831,47	98,81	0,00
- vinagre pronto	713,14	163,40	0,00

Tabela geradora da Figura 3.1 do Artigo 3