



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE
MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA



VANESSA ALEKSANDROV GEHRS

**PRODUÇÃO E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICA DO
VINAGRE DE CERVEJA**

ARARAQUARA
2023

VANESSA ALEKSANDROV GEHRS

**PRODUÇÃO E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICA DO
VINAGRE DE CERVEJA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharela
em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Elias de Souza
Monteiro Filho.

ARARAQUARA
2023

G311p Gehrs, Vanessa Aleksandrov
Produção e análises físico-químicas e microbiológica do
vinagre de cerveja / Vanessa Aleksandrov Gehrs. --
Araraquara, 2023
50 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia
Química) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Química, Araraquara
Orientador: Elias de Souza Monteiro Filho

1. Vinagre. 2. Cerveja. 3. Alimentos naturais. 4. Cultura
(Biologia). 5. Análise. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

VANESSA ALEKSANDROV GEHRS

**PRODUÇÃO E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICA DO
VINAGRE DE CERVEJA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharela
em Engenharia Química.

Araraquara, 23 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elias de Souza Monteiro Filho
Instituto de Química UNESP Araraquara

Documento assinado digitalmente
 **ELIAS DE SOUZA MONTEIRO FILHO**
Data: 03/01/2024 10:33:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dra. Fernanda Zanolli Freitas
Instituto de Química UNESP Araraquara

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDA ZANOLLI FREITAS**
Data: 03/01/2024 14:55:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ossamu Hojo
Instituto de Química UNESP Araraquara

Documento assinado digitalmente
 **OSSAMU HOJO**
Data: 03/01/2024 17:57:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

ARARAQUARA
2023

RESUMO

O vinagre é um produto de grande importância alimentar que remonta à Idade Antiga, quando possuía a finalidade de conservação de alimentos, para que o homem pudesse lidar com os períodos de escassez de recursos. Com o tempo, o vinagre e outros fermentados foram ganhando maior relevância por seus sabores complexos, garantidos pela combinação de seus compostos orgânicos. Essencialmente, o vinagre é uma solução diluída de ácido acético, de 4 a 8% em massa, produzido a partir da fermentação acética do álcool. Existem diversas fontes que originam vinagres com características exclusivas, tais como a maçã, o vinho, o mel e a cerveja. Neste trabalho, preparou-se uma cultura *starter* (“mãe” do vinagre), utilizando a maçã como fonte inicial. A partir disso, o objetivo foi produzir um vinagre de cerveja, com a mãe previamente obtida como *starter* da fermentação, juntamente com a adição de vinagre orgânico a uma versão para fins comparativos. Ao longo do processo, foram realizadas análises de densidade óptica (D.O) e pH, a fim de acompanhar a evolução e o momento ideal para cessar o processo fermentativo. Ao final, também foram determinadas a acidez total, acidez volátil e densidade, utilizando de técnicas como a titulação e destilação por arraste a vapor. Para se verificar o crescimento microbiológico, além das medidas de D.O, foram analisadas amostras do vinagre ao microscópio óptico, verificando as culturas existentes no meio. Constatou-se que houve a produção de ácido acético, porém em baixas quantidades (acidez volátil de 0,280 g/100 mL para o vinagre com adição de orgânico e 0,149 g/100 mL para o vinagre sem adição de orgânico). Houve também uma redução no pH e aumento na D.O de ambos, com um valor final de pH de 3,20 e D.O de 2,613 e pH de 3,29 e D.O de 2,352 para as versões com e sem orgânico, respectivamente. Os resultados se justificam pela análise microbiológica, pois é provável que outras substâncias tenham sido produzidas em razão do crescimento de outras culturas no meio. Seriam necessários mais estudos para se obter as condições ótimas para a produção de um vinagre de cerveja com maior teor de ácido acético.

Palavras-chave: Vinagre; cerveja; orgânico; mãe do vinagre; análises.

ABSTRACT

Vinegar is a product of great importance that dates back to ancient times, when it had the purpose of preserving food, so that man could deal with periods of scarcity of resources. Over time, vinegar and other fermented products gained more relevance due to their complex flavors, guaranteed by the combination of their organic compounds. Essentially, vinegar is a dilute solution of acetic acid, 4 to 8% by mass, produced from the acetic fermentation of alcohol. There are several sources that originate vinegars with exclusive characteristics, such as apple, wine, honey and beer. In this work, the preparation of a mother of vinegar was developed, using the apple as an initial source. From this, the objective was to produce a beer vinegar, with the mother previously obtained as a fermentation starter, together with the addition of organic vinegar to a version for comparative purposes. Throughout the process, analyzes of optical density (OD) and pH were carried out, in order to follow the evolution and the ideal moment to stop the fermentation process. At the end, the total acidity, volatile acidity and density were also determined, using techniques such as titration and steam distillation. In order to verify the microbiological growth, in addition to OD measurements, vinegar samples were analyzed under an optical microscope, verifying the existing cultures in the medium. It was found that there was production of acetic acid, but in low amounts (volatile acidity of 0.280 g/100 mL for vinegar with addition of organic and 0.149 g/100 mL for vinegar without addition of organic). There was also a reduction in the pH and an increase in the OD of both, with a final value of pH of 3.20 and OD of 2.613 and pH of 3.29 and OD of 2.352 for the versions with and without organic, respectively. The results are justified by the microbiological analysis, as it is likely that other substances were produced due to the growth of other cultures in the medium. More studies would be needed to obtain the optimal conditions for the production of a beer vinegar with a higher acetic acid content.

Keywords: Vinegar; beer; organic; mother of vinegar; analyses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mãe do vinagre na superfície do líquido.	12
Figura 2 – Etapa da glicólise.....	13
Figura 3 – Etapa da conversão de piruvato a etanol.	13
Figura 4 – Oxidação do etanol a ácido acético.	14
Figura 5 – Cerveja Bohemia Puro Malte para produção do vinagre.....	21
Figura 6 – PHmetro para análise do vinagre de cerveja.	23
Figura 7 – Soluções tampão de pH 4,00 e 7,00 para calibração do pHmetro.	24
Figura 8 – Espectrofotômetro UV-vis para análise da densidade óptica do vinagre de cerveja.....	25
Figura 9 – Picnômetro de 10 mL contendo vinagre de cerveja.	26
Figura 10 – Conjunto de titulação ácido oxálico-NaOH.....	28
Figura 11 – Conjunto de destilação por arraste a vapor do vinagre de cerveja.....	29
Figura 12 – Fermentados acéticos obtidos a partir da cerveja (com e sem adição de orgânico).....	31
Figura 13 – Gráfico pH ao longo dos dias de fermentação do vinagre de cerveja....	32
Figura 14 – Gráfico D.O ao longo dos dias de fermentação do vinagre de cerveja..	33
Figura 15 – Fermentados acéticos obtidos após adição de etanol ao vinagre (com e sem adição de orgânico).	34
Figura 16 – Gráfico pH ao longo dos dias de fermentação do vinagre de cerveja + etanol.....	35
Figura 17 – Gráfico D.O ao longo dos dias de fermentação do vinagre de cerveja + etanol.....	36
Figura 18 – Registro do vinagre de cerveja com adição de orgânico ao microscópio óptico.	43
Figura 19 – Registro do vinagre de cerveja sem adição de orgânico ao microscópio óptico.	43
Figura 20 – Fotografia do vinagre de cerveja ao microscópio óptico.	44
Figura 21 – Cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ao microscópio óptico.....	44
Figura 22 – Cultura de <i>Acetobacter</i> ao microscópio óptico.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados obtidos de pH, temperatura e densidade óptica para as duas variações do vinagre de cerveja.	31
Tabela 2 – Dados obtidos de pH, temperatura e densidade óptica para vinagre de cerveja + etanol.	35
Tabela 3 – Dados obtidos de massa de hidróxido de sódio e ácido oxálico.....	37
Tabela 4 – Dados obtidos de massa para os conjuntos de picnômetro com diferentes substâncias.	38
Tabela 5 – Densidades relativas para as substâncias analisadas.	38
Tabela 6 – Dados obtidos de volume de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação do vinagre.	39
Tabela 7 – Acidez total para os vinagres com e sem adição de orgânico.	40
Tabela 8 – Dados obtidos de volume de destilado de vinagre de cerveja.	40
Tabela 9 – Dados obtidos de volume de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação dos destilados.	41
Tabela 10 – Acidez volátil para os vinagres com e sem adição de orgânico.....	42

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
1.1	Breve Histórico	9
1.2	A cerveja	10
1.3	O vinagre.....	11
1.4	Fermentação.....	12
1.4.1	Fermentação alcoólica.....	12
1.4.2	Fermentação acética	14
1.5	Parâmetros físico-químicos.....	15
1.5.1	pH	15
1.5.2	Densidade óptica e densidade	15
1.5.3	Titulação e acidez.....	16
2.	OBJETIVOS	17
3.	MATERIAIS	17
3.1	Preparação do vinagre de maçã caseiro	17
3.2	Preparação da mãe do vinagre.....	17
3.3	Produção do vinagre de cerveja e análises diárias.....	18
3.4	Análises físico-químicas finais.....	18
3.5	Análise microbiológica.....	19
4.	METODOLOGIA.....	19
4.1	Obtenção da cultura-mãe.....	19
4.1.1	Preparação do vinagre de maçã caseiro	20
4.1.2	Preparação da mãe do vinagre	20
4.2	Obtenção do vinagre de cerveja.....	21
4.3	Adição de etanol ao vinagre de cerveja.....	22
4.4	Análises físico-químicas	23
4.4.1	pH	23
4.4.2	Temperatura	24
4.4.3	Densidade óptica	24
4.4.4	Densidade.....	25
4.4.5	Acidez total	26

4.4.5.1	Preparo de solução padrão	26
4.4.5.2	Titulação do vinagre de cerveja	28
4.4.6	Acidez volátil	28
4.4.6.1	Destilação por arraste a vapor	29
4.4.6.2	Titulação do destilado de vinagre de cerveja	30
4.5	Análise microbiológica.....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Análise do vinagre de cerveja	30
5.2	Análise do vinagre de cerveja + etanol.....	34
5.2.1	Análises diárias: pH, temperatura e densidade óptica	34
5.2.2	Análises físico-químicas finais: densidade, acidez total e acidez volátil	36
5.2.2.1	Padronização da solução de NaOH 0,1 M	37
5.2.2.2	Densidade	37
5.2.2.3	Acidez total.....	38
5.2.2.4	Acidez volátil	40
5.2.3	Análise microbiológica	43
5.3	Comparação: com x sem adição de vinagre orgânico.....	45
6.	CONCLUSÃO.....	46
7.	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	46
	REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Breve Histórico

Quando se trata da alimentação humana, é essencial que se pense na conservação dos alimentos, tanto para evitar contaminação e propagação de doenças, quanto para aumentar o tempo de vida útil destes alimentos, reduzindo assim o desperdício. Essa é uma questão que está presente desde os primórdios da civilização, uma vez que é intimamente atrelada à sobrevivência humana (GEPEA, 2019).

Historicamente, para lidar com a alternância entre períodos de caça reduzida e abundância, o homem utilizava do cozimento através do fogo e secagem à luz solar, ainda na pré-história, para armazenar os alimentos por um tempo maior (GEPEA, 2019). Nesta época, a fermentação começou a ser conhecida pela fabricação de queijos em cerca de 4000 a.C. (BARBOSA, 2021).

Posteriormente, na Idade Antiga, se utilizavam conservas de sal e vinagre para evitar o apodrecimento da carne. Além disso, também era comum a ingestão de bebidas fermentadas ao invés de água, já que era uma forma mais segura em relação à presença de bactérias e protozoários, que poderiam transmitir doenças (MARKHAM, 2012). Somente na Idade Contemporânea, em 1850, com o desenvolvimento da tecnologia, é que se iniciou a conservação dos alimentos por meio de refrigeração, congelamento e tratamento térmico pela produção de vidros e enlatados (GEPEA, 2019).

Percebe-se que a conservação alimentícia por meios tecnológicos é relativamente recente na história e, nos dias atuais, ainda existem pessoas que não possuem acesso à eletricidade e equipamentos de refrigeração. Além disso, há regiões no mundo que não dispõem de recursos suficientes, o que torna a conservação ainda mais importante. Diante disso, a fermentação se destaca como um método tradicional para aumentar o prazo de duração dos alimentos. Além dessa função essencial, a fermentação também é capaz de produzir sabores únicos, dando origem a produtos como o próprio vinagre, cerveja, vinho, chucrute, kombucha, entre outros (MARKHAM, 2012).

1.2 A cerveja

Atualmente, a cerveja é a terceira bebida mais consumida no mundo, ficando atrás apenas de água e chá. Sua grande importância nas diversas culturas remonta à Antiguidade, cerca de 9000 a.C., época na qual a vida nômade foi substituída gradualmente pelas civilizações, onde os povos passaram a se fixar em determinados locais e então cultivar grãos para sua alimentação (MORADO, 2017).

O cultivo de cereais, como a cevada e o trigo, surgiu inicialmente na Ásia Ocidental e, suspeita-se que os grãos foram expostos à água por acidente, levando à quebra enzimática do amido e posterior fermentação. Uma segunda hipótese seria a exposição de uma massa de pão à água, seguida de uma fermentação. Os sumérios, localizados no sul da Mesopotâmia, foram os primeiros povos que deixaram evidências da cerveja. Registros em pedras foram descobertos, o que demonstrou a grande importância dessa bebida para os povos antigos. A cerveja foi amplamente difundida graças à ascensão do Império Romano, até se tornar popular como nos dias atuais (MORADO, 2017).

Existem diversos tipos de cerveja, mas estes podem ser agrupados em duas famílias principais, segundo o tipo de fermentação: *Ales* e *Lagers*. As primeiras são cervejas de alta fermentação (*top-fermenting beers*), processos realizados sob temperaturas mais altas (15 a 24 °C) com a levedura localizada no topo do líquido. A cepa utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, mais resistente ao álcool. Já as segundas, são cervejas de baixa fermentação (*bottom-fermenting beers*), ocorrendo sob temperaturas mais baixas (5 a 12 °C) e com cepas de leveduras mais frágeis e menos tolerantes ao álcool, *Saccharomyces pastorianus*, localizadas no fundo (HOPSMORE, 2022; MARKHAM, 2012; STEINMEYER, 2022).

As *Ales* são normalmente mais densas, com maior complexidade de sabores e aromas. Além dos ingredientes básicos, o malte e o lúpulo, existem compostos secundários que se formam no processo da fermentação e que contribuem para tornar a cerveja mais complexa, principalmente as do tipo *Ale*. Pela maior resistência ao álcool da cepa de levedura utilizada, normalmente estas cervejas possuem um teor alcoólico maior em relação às do tipo *Lager*. Existem vários estilos dessa cerveja, tais como *Weiss*, *India Pale Ale* (IPA), *Belgian Pale Ale*, *Stout*, etc (ALBANOS, 2020; HOPSMORE, 2022).

As *Lagers* são as cervejas mais consumidas no mundo, sendo aproximadamente 90% de todo o consumo, tais como a *Pilsen*, *American Lager*,

Amber Lager, *Bock*, etc. Estas normalmente são cervejas mais suaves e possuem mais características do malte e do lúpulo, além de um teor alcoólico ligeiramente menor em comparação às cervejas do tipo *Ale*. Devido às características de seu processo, as *Lagers* não necessitam de muito lúpulo na finalização, uma vez que sua fabricação passa por um tratamento à frio. Há ainda uma terceira família das cervejas, chamada *Lambic*, que utilizam da fermentação espontânea a partir de leveduras selvagens, como a *Brettanomyces*. Estas foram as primeiras cervejas produzidas e, normalmente, possuem alta acidez e demoram meses para sua fabricação (ALBANOS, 2020; D'AQUINO, 2020; HOPSMORE, 2022).

1.3 O vinagre

Por definição, o vinagre é uma solução diluída de ácido acético, com teor em volume de 4 a 8%, produzido pela oxidação do álcool em um processo fermentativo, a partir de bactérias do ácido acético (MARKHAM, 2012).

Inicialmente o vinagre pode ser produzido a partir da transformação de uma fonte de açúcar ou álcool. Por esse motivo, existem diversos tipos de vinagre no mercado, os quais guardam as características de sua matéria-prima de origem, tais como: vinagre de vinho, vinagre de arroz, vinagre de maçã, vinagre de mel e vinagre de cerveja.

No caso do vinagre produzido a partir de uma fonte inicial de açúcar, primeiramente ocorre a formação de um álcool, que posteriormente é oxidado a ácido acético. Já quando provém diretamente de um álcool, ocorre somente a etapa de oxidação a ácido acético. A partir disso, o vinagre é capaz de limitar o crescimento de microrganismos patógenos no meio, a partir da redução de seu pH e maior toxicidade a estes microrganismos (MARKHAM, 2012).

Dentre inúmeras outras, as bactérias do ácido acético podem ser encontradas facilmente nas bebidas, sendo conhecidas como "mãe do vinagre", a cultura necessária para produção do vinagre. Antigamente, eram denominadas *Mycoderma aceti*, uma substância de aspecto gelatinoso formada na superfície do líquido (Figura 1). Atualmente, são denominadas *Acetobacter aceti* em sua maioria. Pela cerveja possuir alto teor nutricional e baixo teor alcoólico, é extremamente suscetível à acetificação nas condições adequadas (MARKHAM, 2012).

Figura 1 – Mãe do vinagre na superfície do líquido.



Fonte: PRESERVE & PICKLE, 2019.

1.4 Fermentação

O processo fermentativo possibilita que elementos que seriam o suporte para a degradação de alimentos, como o açúcar, sejam transformados em elementos capazes de retardá-la, como o álcool ou o ácido acético (MARKHAM, 2012). Assim sendo, de acordo com os produtos finais, existem três tipos de fermentação: alcoólica, acética e láctica. Para os objetivos deste trabalho, serão melhor descritas a fermentação alcoólica e a acética, de interesse para a produção de vinagre.

Durante o processo fermentativo, ocorre a formação do composto principal e de vários outros componentes, os quais podem se combinar e afetar os sabores e aromas finais do produto. Ésteres podem ser originados da combinação de ácidos orgânicos e álcoois formados no processo, possibilitando uma maior complexidade aos alimentos. Estes também podem ser recombinados durante a etapa de envelhecimento, no qual existe ainda maior formação de sabores e aromas complexos (MARKHAM, 2012).

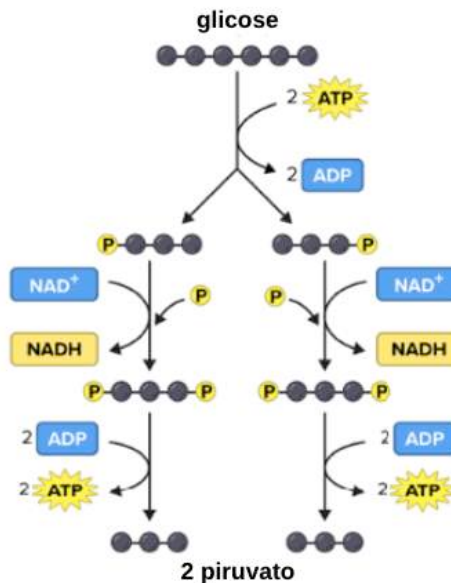
1.4.1 Fermentação alcoólica

Este tipo de fermentação ocorre para obtenção de energia celular pelas leveduras, a partir da utilização de açúcares pelas células, como a glicose, gerando produtos primários, como o etanol e o dióxido de carbono. Além disso, produtos secundários, como aldeídos, ésteres, ácidos orgânicos e outros álcoois são formados e compõem o meio final (CRUZ, 2016).

Este é um processo anaeróbio, ou seja, sem a presença de oxigênio, realizado por uma cultura pura de leveduras do gênero *Saccharomyces*, e está envolvido na produção de bebidas alcoólicas em geral, como cervejas e vinhos. (CRUZ, 2016;

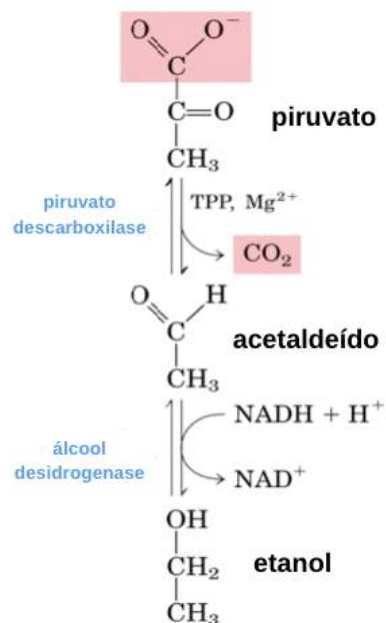
ROCHA, 2016). Inicialmente, ocorre a etapa da glicólise, onde a partir de 10 reações sucessivas obtêm-se duas moléculas de piruvato, um composto intermediário (Figura 2). Este é descarboxilado e libera dióxido de carbono (CO_2) e acetaldeído. Este por sua vez é reduzido pela coenzima NADH, gerando a produção de etanol e NAD^+ (Figura 3).

Figura 2 – Etapa da glicólise.



Fonte: Adaptado de CK-12, 2023.

Figura 3 – Etapa da conversão de piruvato a etanol.



Fonte: Adaptado de CRUZ, 2016.

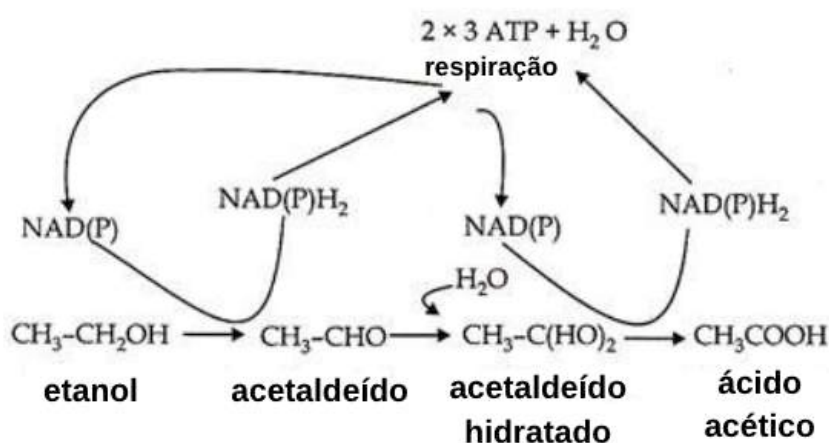
Para este trabalho, a fermentação alcoólica estará envolvida apenas na etapa inicial da formação da mãe do vinagre. Por esse motivo, será dado maior enfoque à fermentação acética, descrita no item 1.4.2 .

1.4.2 Fermentação acética

Este tipo de fermentação ocorre a partir de uma cultura mista de *Acetobacter*, na qual as cepas mais produtivas e adequadas são selecionadas naturalmente a partir das condições do meio. Estas são bactérias gram-negativas e se apresentam na forma de bastonetes elipsoidais, podendo ser retos ou ligeiramente curvos. Ocorrem de forma isolada, aos pares ou em cadeias e são obrigatoriamente aeróbicas. Dentre as espécies, existem a *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter acidophilum*, etc. (AQUARONE et. al., 2001; ROCHA, 2016).

A fermentação acética é um processo aeróbio, ou seja, ocorre na presença de oxigênio, em etapas: primeiramente, o etanol é oxidado ao intermediário acetaldeído, com participação da coenzima fosforilada NAD(P), a qual se reduz a NAD(P)H₂. Então, o acetaldeído é hidratado por uma molécula de água. Em seguida, o acetaldeído sofre uma nova oxidação, gerando o NAD(P)H₂ reduzido e o ácido acético como produto final (Figura 4). Nota-se que ocorre regeneração do NAD(P) na cadeia transportadora de elétrons, permitindo a continuidade do processo.

Figura 4 – Oxidação do etanol a ácido acético.



Fonte: Adaptado de BIOTECHNOLOGY NOTES, 2018.

O processo de fermentação acética possui maior rendimento quando realizado em temperaturas entre 25 e 30 °C, sendo reduzido em temperaturas abaixo de 15 °C e acima de 35 °C (RIZZON, 2006).

1.5 Parâmetros físico-químicos

1.5.1 pH

O pH, também conhecido como "potencial hidrogeniônico" de um meio, indica o grau de acidez em uma escala logarítmica compreendida entre 0 e 14 a 25 °C. Para as soluções ácidas, o pH varia entre 0 a 7; soluções neutras possuem pH igual a 7; soluções básicas apresentam pH entre 7 e 14 (FOGAÇA, 2023).

A partir do valor de pH pode-se obter a concentração de íons H^+ do meio, e vice-versa, dado pela Equação 1, com $[H^+]$ em mol/L.

$$pH = -\log[H^+] \quad (1)$$

Este parâmetro pode ser medido de forma precisa com um equipamento denominado pHmetro. Ou ainda, é possível obter faixas de pH utilizando indicadores ácido-base, como a fenolftaleína, indicador universal e papel de tornassol (FOGAÇA, 2023).

Para este trabalho, o pH do vinagre de cerveja será determinado utilizando o equipamento próprio, calibrado com soluções tampão.

1.5.2 Densidade óptica e densidade

A densidade óptica é uma medida de absorção das partículas de luz que atravessam um determinado meio. A partir da determinação de um "branco", tem-se a densidade óptica do meio em análise, utilizando um equipamento denominado espectrofotômetro (ALST et. al., 2023).

Este parâmetro está diretamente relacionado com a quantidade de células e com o crescimento microbiológico, sendo proporcionais. Ou seja, quanto maior a densidade óptica, maior o número de células do meio. É realizada a análise em determinado comprimento de onda, que é mais adequado para o tipo de microrganismo envolvido (ALST et. al., 2023).

A densidade é uma propriedade que reflete a quantidade de massa em determinado volume de material, que depende das condições de pressão e temperatura. Pode ser determinada também a densidade relativa, como sendo a razão entre as densidades de uma substância de interesse e de outra padrão, normalmente a água a 25 °C (LIMA, 2023). Estas podem ser calculadas pelas Equações 2 e 3, em

que d : densidade, m : massa, V : volume, d_{AB} : densidade relativa da substância A em relação a B, d_A : densidade da substância A e d_B : densidade da substância B.

$$d = \frac{m}{V} \quad (2)$$

$$d_{AB} = \frac{d_A}{d_B} \quad (3)$$

1.5.3 Titulação e acidez

A titulação ácido-base é uma técnica empregada para se determinar a concentração de um analito, utilizando uma solução padrão de concentração conhecida. A solução padrão empregada pode ser obtida a partir de um padrão primário, substâncias de alto grau de pureza (99,9% em massa), estável, não higroscópico, altamente solúvel e de fácil obtenção (MATOS, 2019).

A reação de neutralização entre um ácido e uma base, utilizando o indicador como determinante do ponto de viragem, possibilita a obtenção da quantidade de titulante utilizado. Dessa forma, a partir da proporção estequiométrica da reação, pode-se determinar a quantidade e a concentração de titulado. Para isso, pode-se utilizar das Equações 4 e 5, que relacionam o número de mols (n), a concentração em mol/L (μ), o volume da solução (V), a massa (m) e a massa molar (M).

$$\mu = \frac{n}{V} \quad (4)$$

$$n = \frac{m}{M} \quad (5)$$

A acidez de um meio está diretamente relacionada com as substâncias de caráter ácido que o compõe, sendo caracterizada pela acidez total e volátil. Ambas podem ser analisadas utilizando a técnica de titulação. A primeira representa a quantidade de ácido total na amostra capaz de neutralizar uma quantidade determinada de uma substância básica. Já a acidez volátil, representa a quantidade de ácido que se volatilizou em uma etapa anterior, como a destilação por arraste a vapor. Neste caso, é medida a acidez referente aos ácidos voláteis que são neutralizados com uma determinada substância básica.

2. OBJETIVOS

Produzir um vinagre de cerveja a partir da obtenção de uma mãe do vinagre; analisar os parâmetros físico-químicos e a composição microbiológica do produto final; comparar os resultados com e sem adição de vinagre orgânico ao processo.

3. MATERIAIS

Para a realização dos procedimentos envolvidos na produção e análise do vinagre de cerveja, foi necessário ter disponibilidade dos seguintes materiais,

3.1 Preparação do vinagre de maçã caseiro

- Maçãs
- Água filtrada
- Açúcar cristal orgânico
- Liquidificador
- Recipientes de vidro
- Elástico de borracha
- Espátula
- Coador
- Vinagre orgânico de maçã Senhor Viccino

3.2 Preparação da mãe do vinagre

- Vinagre de maçã caseiro obtido previamente
- Cerveja Bohemia Puro Malte
- Recipientes de vidro
- Espátula
- Copo medidor
- Papel toalha
- Elástico de borracha
- Papel alumínio
- Geladeira

3.3 Produção do vinagre de cerveja e análises diárias

- Béqueres de 1000 mL
- Mãe do vinagre obtida previamente
- Proveta de 250 mL
- Cerveja Bohemia Puro Malte
- Bagueta de vidro
- Papel toalha
- Elástico de borracha
- Papel alumínio
- PHmetro
- Água destilada
- Béquer de 50 mL
- Soluções tampão pH 4,00 e pH 7,00
- Espectrofotômetro UV-Vis
- Pipeta de Pasteur
- Cubetas de vidro
- Etanol
- Proveta de 10 mL

3.4 Análises físico-químicas finais

- Picnômetro de 10 mL
- Vinagre de cerveja obtido previamente
- Papel toalha
- Balança analítica
- Água destilada
- Termômetro
- Balão volumétrico de 250 mL
- Hidróxido de sódio P.A.
- Béquer de 100 mL
- Agitador magnético
- Funil de vidro
- Ácido oxálico dihidratado P.A.
- Papel encerado

- Erlenmeyers de 250 mL
- Fenolftaleína 1%
- Bureta de 100 mL
- Suporte universal
- Pipeta volumétrica de 10 mL com pera
- Balão de 3 bocas de 500 mL
- Manta de aquecimento
- Pérolas de vidro
- Conexões e garras
- Rolhas
- Condensador
- Mangueira
- Recirculador de água

3.5 Análise microbiológica

- Vinagre de cerveja obtido previamente
- Pipeta automática com ponteira 1000 μ L
- Capela de fluxo laminar
- Lâminas de vidro
- Corante violeta genciana
- Água destilada
- Corante lugol
- Álcool etílico 95%
- Corante safranina
- Chapa de aquecimento
- Óleo de imersão
- Microscópio óptico

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção da cultura-mãe

Diante da necessidade de se ter uma cultura-mãe para a fermentação acética da cerveja, foi adotada como estratégia inicial a preparação de um vinagre caseiro a

partir da maçã. Isso devido à facilidade de acesso da maçã como matéria-prima e possibilidade de desenvolvimento do meio contendo microrganismos responsáveis pela produção de vinagre, que posteriormente seriam utilizados para a fermentação desejada.

4.1.1 Preparação do vinagre de maçã caseiro

A preparação foi realizada seguindo o vídeo da receita no YouTube (KAYOKO TAKEDA, 2022). Com 700 g de maçã cortada e descascada, 1,5 L de água filtrada e meia xícara de açúcar cristal orgânico, foi utilizada a função pulsar do liquidificador até se obter uma mistura relativamente homogênea.

Esta mistura foi colocada em um vidro de boca larga e coberta com papel toalha e elástico para evitar a contaminação por insetos. Uma vez ao dia, o conteúdo foi agitado com espátula e, após 10 dias de fermentação ativa, foi coado e transferido para dois recipientes de vidro, cada um contendo 750 mL do líquido.

Em um recipiente, foi acrescentado 125 mL de vinagre orgânico de maçã Senhor Viccino. Esta quantidade foi determinada pela proporção com base na receita do site Globo (GLOBO, 2022). Então, aguardou-se a finalização do processo por mais três semanas.

Dessa forma, para fins comparativos, se utilizou de duas variações do vinagre de maçã caseiro: uma contendo adição de vinagre orgânico à receita e a outra sem adição de orgânico. Essa diferença foi estabelecida para análise de resultados futuros, uma vez que o vinagre orgânico serve também como um inoculador dos microrganismos da fermentação acética.

4.1.2 Preparação da mãe do vinagre

Para preparar a mãe, utilizou-se de dois recipientes, cada um contendo 350 mL de cerveja Bohemia Puro Malte 5,0% vol. alcoólico (conforme Figura 5).

Figura 5 – Cerveja Bohemia Puro Malte para produção do vinagre.



Fonte: A Autora, 2023.

Foi calculado o volume de vinagre de maçã caseiro utilizado, como sendo referente a 30% do total de cerveja. Dessa forma,

$$30\% \times 350\text{mL} = 105\text{mL vinagre de maçã caseiro}$$

Então, com o copo medidor, foi transferido o volume necessário de vinagre de maçã caseiro para cada recipiente, um da referência com adição de orgânico e outro sem adição de orgânico.

Foi agitado com o auxílio de uma espátula e coberto com papel toalha e elástico, para permitir a passagem de ar e possibilitar a ocorrência da fermentação. Além disso, os recipientes foram envolvidos com papel alumínio a fim de reduzir a luz solar e evitar processos oxidativos.

Uma vez ao dia, agitaram-se os conteúdos com espátula por alguns segundos, para homogeneizar o meio e aumentar a aeração. O processo foi continuado até atingir o máximo da concentração de ácido acético, notado principalmente pelo odor característico. Então, teve fim a obtenção da mãe do vinagre, o *starter* da fermentação, que foi conservado no mesmo recipiente, com tampa, em geladeira.

4.2 Obtenção do vinagre de cerveja

A mesma proporção do item 4.1.2 foi utilizada para se obter o vinagre de cerveja, em laboratório.

Em cada um de dois béqueres de 1000 mL, foi adicionado 105 mL de mãe do vinagre, com e sem adição de orgânico, utilizando de uma proveta de 250 mL. A cada

béquer, acrescentou-se 350 mL de cerveja Bohemia Puro Malte (5,0% vol. alcoólico) e o conteúdo foi agitado com bagueta de vidro.

O mesmo procedimento do item 4.1.2 foi realizado, cobrindo com papel toalha, elástico e papel alumínio. As agitações foram realizadas diariamente e, neste caso, foram coletados dados de pH, temperatura e densidade óptica na mesma frequência. A temperatura foi mantida aproximadamente constante durante todo o processo, em 22 °C, para maior controle sobre a fermentação.

Em teoria, o processo da fermentação deveria ocorrer no período de três semanas (KAYOKO TAKEDA, 2022). Porém, devido às condições específicas no experimento, as análises realizadas diariamente mostraram que o pH se estabilizou em um menor tempo. Quando o pH não mais variou significativamente, o experimento foi interrompido e considerou-se que foi atingida a máxima concentração de ácido acético possível. Ao final, foi obtido o fermentado acético a partir da cerveja.

4.3 Adição de etanol ao vinagre de cerveja

A fim de se verificar a resposta microbiológica e se obter um vinagre com maior teor de acidez, foi adicionado etanol a 3% ao vinagre de cerveja obtido anteriormente. Este percentual foi determinado de forma a ser ligeiramente menor do que o teor alcoólico da cerveja original, para não haver risco de eventuais limitações no crescimento dos microrganismos. O etanol foi acrescentado em ambos os béqueres (com e sem adição de orgânico) e a temperatura também foi mantida aproximadamente constante durante todo o processo, em 22 °C,

Nesta etapa, primeiramente tomou-se duas alíquotas de 200 mL, uma de cada béquer, utilizando uma proveta de 250 mL e transferindo-as para dois novos béqueres. Foi calculada a quantidade necessária de etanol a ser adicionado para que a sua concentração na solução fosse de 3% em volume.

Sendo V o volume de etanol a ser adicionado, este corresponde a 3% do total em volume após a adição ($200 \text{ mL} + V$), então

$$V = 3\% \times (200 \text{ mL} + V)$$

$$V = 6,19 \text{ mL de etanol}$$

Utilizando uma proveta de 10 mL, foi coletado o volume correspondente de etanol e adicionado, com auxílio de bagueta de vidro, a cada um dos béqueres contendo o vinagre de cerveja previamente acrescentado.

As mesmas análises do item 4.2 foram repetidas para o sistema vinagre de cerveja + etanol. Além de todas as medições realizadas diariamente de pH, temperatura e densidade óptica, foram analisados também a densidade, a acidez total e a acidez volátil do produto final.

4.4 Análises físico-químicas

As análises descritas a seguir foram realizadas de acordo com os métodos físico-químicos para análise de alimentos (ZENEBAON et. al., 2008).

4.4.1 pH

Diariamente, após agitação do conteúdo dos béqueres, foram realizadas as medições de pH, utilizando um pHmetro. Além disso, com o mesmo equipamento, mediu-se também o pH da solução original, ou seja, somente cerveja, para verificar a variação nos resultados futuros. O equipamento pode ser visualizado pela Figura 6.

Figura 6 – PHmetro para análise do vinagre de cerveja.



Fonte: A Autora, 2023.

Primeiramente, ao remover a capa protetora do bulbo do equipamento, foi realizada a lavagem do eletrodo com água destilada, utilizando um béquer de 50 mL para descarte. Em seguida, o equipamento foi calibrado com duas soluções tampão, uma de pH 4,00 e outra de pH 7,00 (Figura 7).

Após a calibração, foi removido o papel toalha que cobria o béquer e inserido o eletrodo na solução em estudo. Assim que os valores indicados no painel se estabilizavam, estes foram anotados para consultas posteriores.

Figura 7 – Soluções tampão de pH 4,00 e 7,00 para calibração do pHmetro.



Fonte: A Autora, 2023.

O eletrodo foi então removido da solução e lavado novamente com água destilada, sendo recolocada a capa protetora do bulbo. A cada nova medição, uma nova calibração foi realizada para garantir que o equipamento aferisse os valores corretos.

4.4.2 Temperatura

A temperatura foi mantida aproximadamente constante durante todo o processo fermentativo em 22 °C, porém, pequenas variações poderiam ocorrer devido a eventuais aberturas do local. Por isso, a temperatura também foi medida diariamente por um termômetro contido no pHmetro. Dessa forma, o procedimento para medição da temperatura foi equivalente ao item 4.4.2, uma vez que era juntamente indicada no painel do equipamento.

4.4.3 Densidade óptica

Para as análises de densidade óptica, foi utilizado um espectrofotômetro UV-vis, mostrado na Figura 8.

Figura 8 – Espectrofotômetro UV-vis para análise da densidade óptica do vinagre de cerveja.



Fonte: A Autora, 2023.

Ao remover o papel toalha dos béqueres contendo o vinagre de cerveja, foram coletadas duas alíquotas com pipeta de Pasteur e transferidos para duas cubetas de vidro. A terceira cubeta de vidro foi preenchida com o branco, correspondente à cerveja Bohemia Puro Malte.

Inicialmente, abriu-se o compartimento de amostras e foi inserida a cubeta contendo o branco, fechando a porta. Foi ajustada a faixa de comprimento de onda da análise para 420 nm, de acordo com a Instrução Normativa nº 6, de 3 de abril de 2012 (ANAV, 2012), e foi pressionado o botão para zerar o equipamento, de forma que a cerveja pura seria a solução de referência.

Então, a cubeta contendo o branco foi retirada e substituída pelas duas outras cubetas. Aguardou-se a estabilização do valor, registrando a densidade óptica de cada uma das soluções. Este mesmo procedimento foi realizado com todas as alíquotas diárias de fermentado acético.

4.4.4 Densidade

A densidade foi obtida com uma única análise ao final do processo, utilizando de um picnômetro de 10 mL. Primeiro, este foi pesado em uma balança analítica para obter a massa do picnômetro vazio. Em seguida, com a pipeta de Pasteur, foi coletada uma amostra do béquer com adição de orgânico e transferida ao picnômetro até completar seu volume.

Este foi tampado de forma a transbordar a solução em seu interior e com o auxílio de papel toalha realizou-se a limpeza de sua parte externa, para garantir a pesagem correta. O picnômetro foi pesado novamente, agora com a solução, e foi registrada sua massa. O conjunto pode ser visualizado na Figura 9.

Figura 9 – Picnômetro de 10 mL contendo vinagre de cerveja.



Fonte: A Autora, 2023.

As mesmas etapas foram repetidas para a solução do béquer sem adição de orgânico. Também foi realizado o procedimento para a pesagem do picnômetro com água destilada, a fim de se obter a densidade relativa a uma dada temperatura, no caso, 22,5 °C.

4.4.5 Acidez total

A análise de acidez total foi realizada a partir de uma titulação do produto final. Para realizar esta titulação, anteriormente, foi necessário obter uma solução padrão, de acordo com o item 4.4.5.1.

4.4.5.1 Preparo de solução padrão

Foi preparada uma solução padrão de NaOH 0,1 M. Para os cálculos, utilizou-se das Equações 4 e 5 do item 1.5.3. Utilizando de um balão volumétrico de 250 mL, a quantidade em mols de NaOH neste volume seria,

$$0,1 \text{ mol/L} \times 250 \text{ mL} \times 1 \text{ L} / 1000 \text{ mL} = 0,025 \text{ mol NaOH}$$

Como a massa molar de hidróxido de sódio P.A. é de 40,01 g/mol, tem-se a massa necessária para preparar a solução,

$$0,025 \text{ mol} \times 40,01 \text{ g/mol} = 1,00025 \text{ g NaOH}$$

Utilizando uma balança analítica, pesou-se rapidamente uma certa massa de hidróxido de sódio P.A. em um béquer de 100 mL, próxima de 1 g. Anotou-se o valor exato para análise posterior. Foi adicionada água destilada até metade do béquer, o qual foi colocado em um agitador magnético para dissolução total do reagente. Em seguida, o conteúdo do béquer foi transferido ao balão volumétrico de 250 mL, utilizando funil de vidro. Completou-se o volume com água destilada até o menisco e homogeneizou-se a solução.

Tendo a solução de NaOH, foi necessário obter um padrão primário para se determinar a real concentração da solução e realizar a titulação do vinagre de cerveja. Para isso, foi utilizado o ácido oxálico dihidratado P.A. ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$). Em 50 mL da solução de NaOH 0,1 M, a quantidade em mols existentes é

$$0,1 \text{ mol/L} \times 50 \text{ mL} \times 1 \text{ L} / 1000 \text{ mL} = 0,005 \text{ mol NaOH}$$

Como o ácido oxálico possui dois hidrogênios ionizáveis, então para 1 mol de ácido são necessários 2 mols de hidróxido, a fim de neutralizar a solução. Dessa forma, a quantidade em mols de ácido oxálico para neutralizar 50 mL da solução de NaOH 0,1 M seria,

$$0,005 \text{ mol NaOH} \times 1 \text{ molác. oxálico} / 2 \text{ mol NaOH} = 0,0025 \text{ molác. oxálico}$$

A massa molar de ácido oxálico dihidratado P.A. é de 126,07 g/mol, logo foi possível calcular a massa a ser pesada,

$$0,0025 \text{ molác. oxálico} \times 126,07 \text{ g/mol} = 0,3152 \text{ gác. oxálico}$$

Então, pesou-se uma quantidade de ácido oxálico próxima à calculada, em papel encerado e na balança analítica, e anotou-se o resultado. Esta foi transferida a um erlenmeyer de 250 mL, ao qual foi adicionado 50 mL de água destilada com três gotas do indicador fenolftaleína a 1%.

Para a titulação do ácido oxálico, colocou-se o erlenmeyer anterior em um agitador magnético e utilizou-se uma bureta de 100 mL com suporte universal, devidamente ambientada, contendo a solução de NaOH (Figura 10). Foi realizada a titulação pelo gotejamento até o ponto de viragem, anotando o volume gasto de NaOH.

Figura 10 – Conjunto de titulação ácido oxálico-NaOH.



Fonte: A Autora, 2023.

4.4.5.2 Titulação do vinagre de cerveja

Após o preparo da solução padronizada, foi possível iniciar a titulação do vinagre. Para isso, em uma pipeta volumétrica de 10 mL com pera, foram coletadas alíquotas de vinagre dos béqueres com e sem adição de orgânico. Estas alíquotas foram transferidas a dois erlenmeyers previamente identificados, sendo então adicionados 100 mL de água destilada a cada um.

As duas titulações foram realizadas seguindo o mesmo procedimento anterior, sendo análogo à Figura 10, e os volumes gastos de NaOH para neutralizar a solução com vinagre foram anotados.

4.4.6 Acidez volátil

Para a acidez volátil, foi necessário se obter o destilado pelo método de arraste a vapor. Posteriormente, seguiu-se a titulação do destilado utilizando também da solução padrão de NaOH.

4.4.6.1 Destilação por arraste a vapor

Para se determinar a acidez volátil, foi necessário realizar a destilação por arraste a vapor. Com a pipeta volumétrica de 10 mL, transferiu-se uma alíquota de vinagre de cerveja com adição de orgânico, para um balão de 3 bocas de 500 mL. Em seguida, acrescentou-se 250 mL de água destilada.

O aparelho de destilação pode ser observado na Figura 11 e foi montado, contendo: suporte universal, manta de aquecimento, balão de 3 bocas de 500 mL com água destilada e pérolas de vidro, termômetro, conexões, rolhas e garras, papel alumínio, condensador, mangueira e recirculador de água. O papel alumínio foi utilizado para isolar algumas mangueiras e minimizar a perda de calor. Também foi necessário um erlenmeyer de 250 mL para coletar o destilado.

Figura 11 – Conjunto de destilação por arraste a vapor do vinagre de cerveja.



Fonte: A Autora, 2023.

O aquecimento foi ligado e foi aguardada a liberação de vapor com a rolha aberta, para eliminar os gases iniciais. Logo após, o sistema foi fechado e manteve o processo até que se coletasse pelo menos 100 mL de destilado. Após a coleta, também foi realizada a destilação por arraste a vapor para a amostra de vinagre de cerveja sem adição de orgânico, seguindo as mesmas etapas.

4.4.6.2 Titulação do destilado de vinagre de cerveja

Com os destilados obtidos, foram anotados seus volumes coletados e executadas duas titulações com a solução padrão de NaOH que havia sido preparada. Os mesmos procedimentos do item 4.4.5.2 e o mesmo aparato da Figura 10 foram utilizados neste caso. Os volumes gastos de NaOH também foram registrados.

4.5 Análise microbiológica

Para realizar a análise da composição microbiológica do vinagre de cerveja, foi realizada a coloração de Gram e verificação com microscópio óptico. Inicialmente, foram coletadas duas alíquotas de 1 mL, referentes aos vinagres com e sem adição de orgânico. Esta coleta foi realizada em capela de fluxo laminar e com auxílio de uma pipeta automática de 1000 μ L.

Em seguida, foram feitos os esfregaços das alíquotas em duas lâminas de vidro, as quais foram transferidas para uma chapa de aquecimento por alguns segundos, até que as amostras fossem secas. Então, pela técnica da coloração de Gram, cobriu-se os esfregaços com a solução de violeta genciana e, após 1 minuto, realizou-se a lavagem com água destilada.

O mesmo foi realizado com a solução de lugol e então a solução de álcool etílico 95% foi acrescentada, até descolorir totalmente as lâminas. Estas foram novamente lavadas com água destilada e cobertas com corante safranina, por 30 segundos. Após última lavagem das lâminas, foi realizada a secagem na chapa de aquecimento e aplicada uma gota de óleo de imersão em cada. Com o microscópio óptico em aumento de 630x, observou-se as culturas presentes no meio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do vinagre de cerveja

O processo fermentativo do vinagre de cerveja durou em torno de 16 dias, sendo constatado, ao longo dos dias, um aumento do odor característico de ácido acético, reforçando o êxito da fermentação. Em ambos os béqueres, com e sem adição de orgânico, os aromas apresentados foram semelhantes, assim como a formação da camada superficial amarelada, característica do tipo de microrganismo envolvido. A Figura 12 mostra os fermentados obtidos ao final dos 16 dias.

Figura 12 – Fermentados acéticos obtidos a partir da cerveja (com e sem adição de orgânico).



Fonte: A Autora, 2023.

A Tabela 1 mostra os valores de pH, temperatura e densidade óptica obtidos pelas análises diárias do vinagre de cerveja, com e sem adição de orgânico. Neste caso, ainda se tratava do produto final puro, sem adição posterior de etanol.

É importante ressaltar que as análises foram realizadas apenas em dias úteis devido à disponibilidade do laboratório, localizado no prédio da Engenharia Química do campus da UNESP Araraquara. Por isso, algumas linhas da tabela encontram-se em branco, referente aos dias em que não houve medição.

Tabela 1 – Dados obtidos de pH, temperatura e densidade óptica para as duas variações do vinagre de cerveja.

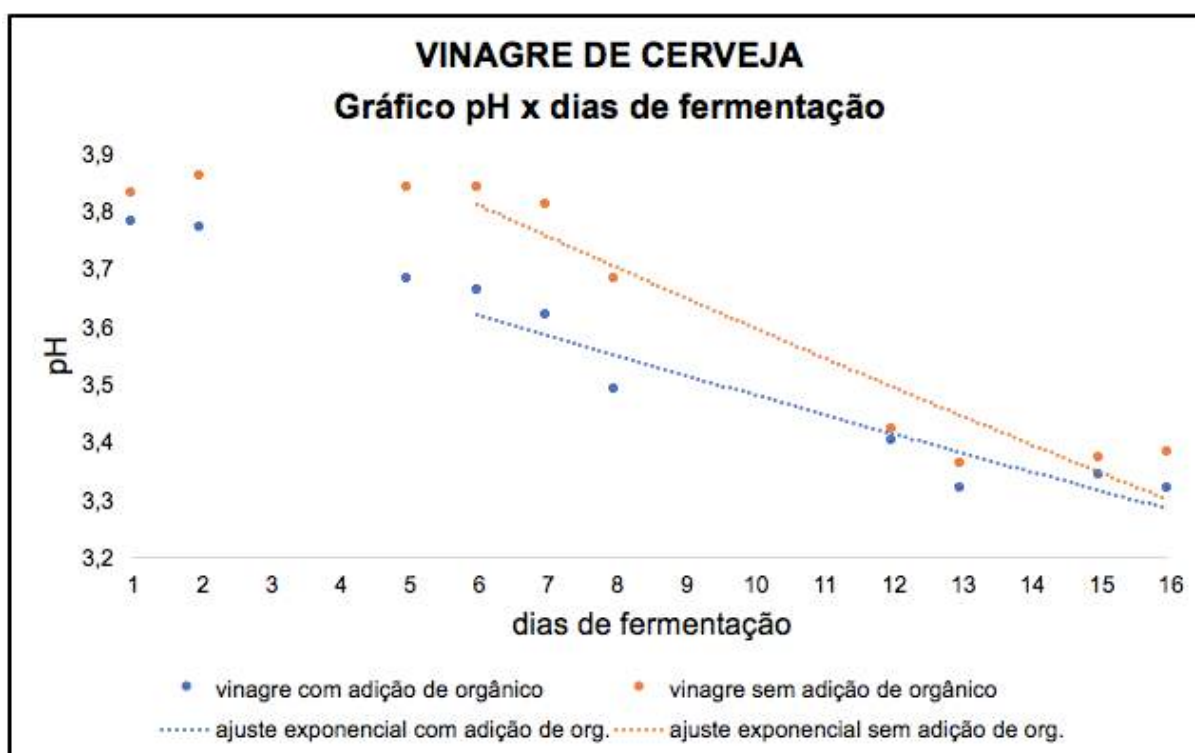
Dia	Com adição de orgânico			Sem adição de orgânico		
	pH	T (°C)	D.O	pH	T (°C)	D.O
1	3,78	24	1,391	3,83	24	1,304
2	3,77	23	0,889	3,86	23	0,889
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	3,68	22	1,502	3,84	22	1,393
6	3,66	22	1,650	3,84	22	1,466
7	3,62	22	1,809	3,81	22	1,481
8	3,49	22	1,940	3,68	22	1,557
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-

11	-	-	-	-	-	-
12	3,40	22	1,758	3,42	22	1,785
13	3,32	22	2,238	3,36	22	1,862
14	-	-	-	-	-	-
15	3,34	21	2,318	3,37	21	1,943
16	3,32	21	2,358	3,38	21	2,027

Legenda: T: temperatura (em graus Celsius); D.O: densidade óptica.

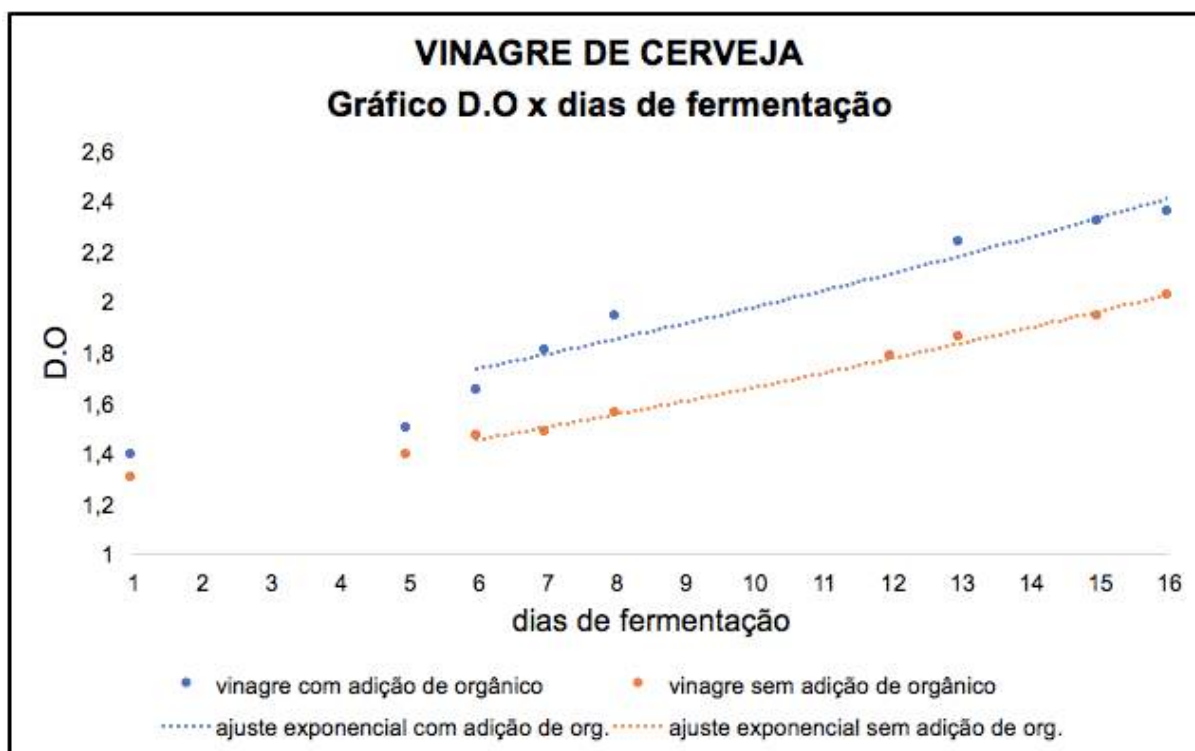
As Figuras 13 e 14 apresentam os dados da Tabela 1, na forma de gráficos. Neles estão os valores de pH e D.O, obtidos em função dos dias de fermentação do vinagre de cerveja. Para ambos os parâmetros, foram realizados ajustes exponenciais, a partir do dia 6, a fim de se determinar a curva mais próxima que contém os pontos de análise. Esse ajuste foi considerado a partir do sexto dia, pois os pontos representavam visualmente a fase de crescimento exponencial dos microrganismos. É possível notar que até o dia 6, não houve grande variação de pH e D.O, uma vez que se tratava do período de adaptação microbiológica.

Figura 13 – Gráfico pH ao longo dos dias de fermentação do vinagre de cerveja.



Fonte: A Autora, 2023.

Figura 14 – Gráfico D.O ao longo dos dias de fermentação do vinagre de cerveja.



Fonte: A Autora, 2023.

Analisando os gráficos, percebe-se que durante o processo houve diminuição do pH e aumento da D.O, conforme o esperado. Isso porque a fermentação acética é responsável por transformar o etanol em ácido acético, em sua maioria, contribuindo para o aumento da concentração de íons H^+ no meio e reduzindo, dessa forma, o potencial hidrogeniônico do sistema. Nota-se que o líquido inicial já apresentava um caráter ácido, uma vez que o $pH < 7$, que foi incrementado pelo processo fermentativo.

A densidade óptica está diretamente ligada à turbidez e à quantidade de células do meio. Esta apresentou um aumento em relação à medida inicial, devido ao crescimento e multiplicação dos microrganismos. As medidas de D.O do dia 2 (para ambos os vinagres) e do dia 12 (para o vinagre com adição de orgânico) foram desconsideradas na construção dos gráficos, uma vez que estas apresentaram um desvio da tendência ao crescimento de D.O, devido a provável má homogeneização do líquido, o que refletiu em erros na medição.

A temperatura do meio se manteve aproximadamente constante em $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante todo o experimento, como esperado. Ao final dessa etapa, o vinagre com adição de orgânico apresentou um pH de 3,32 e uma densidade óptica de 2,358. Já o vinagre sem adição de orgânico teve um pH de 3,38 e uma densidade óptica de 2,027.

Para fins comparativos, o pH da cerveja pura foi medido, obtendo como valor 4,20. Também é possível perceber que o líquido inicial já se apresentava mais ácido do que a cerveja pura (pH 3,78 com adição de orgânico e pH 3,83 sem adição de orgânico), em função das etapas anteriores que foram realizadas para inoculação microbiológica.

5.2 Análise do vinagre de cerveja + etanol

Após a adição de etanol a 3% (em volume) ao vinagre de cerveja, deu-se sequência ao processo fermentativo. Neste caso, não houve alteração significativa nos aromas e a fermentação foi interrompida em torno de 6 dias, devido à estabilização do pH constatado pelas análises. A Figura 15 mostra os fermentados acéticos obtidos ao final dos 6 dias após a adição de etanol.

Figura 15 – Fermentados acéticos obtidos após adição de etanol ao vinagre (com e sem adição de orgânico).



Fonte: A Autora, 2023.

5.2.1 Análises diárias: pH, temperatura e densidade óptica

A Tabela 2 mostra os valores de pH, temperatura e densidade óptica obtidos pelas análises diárias do vinagre de cerveja + etanol, com e sem adição de orgânico. Também se repete a ausência de medidas em alguns dias, devido à disponibilidade

do laboratório, localizado no prédio da Engenharia Química do campus da UNESP Araraquara.

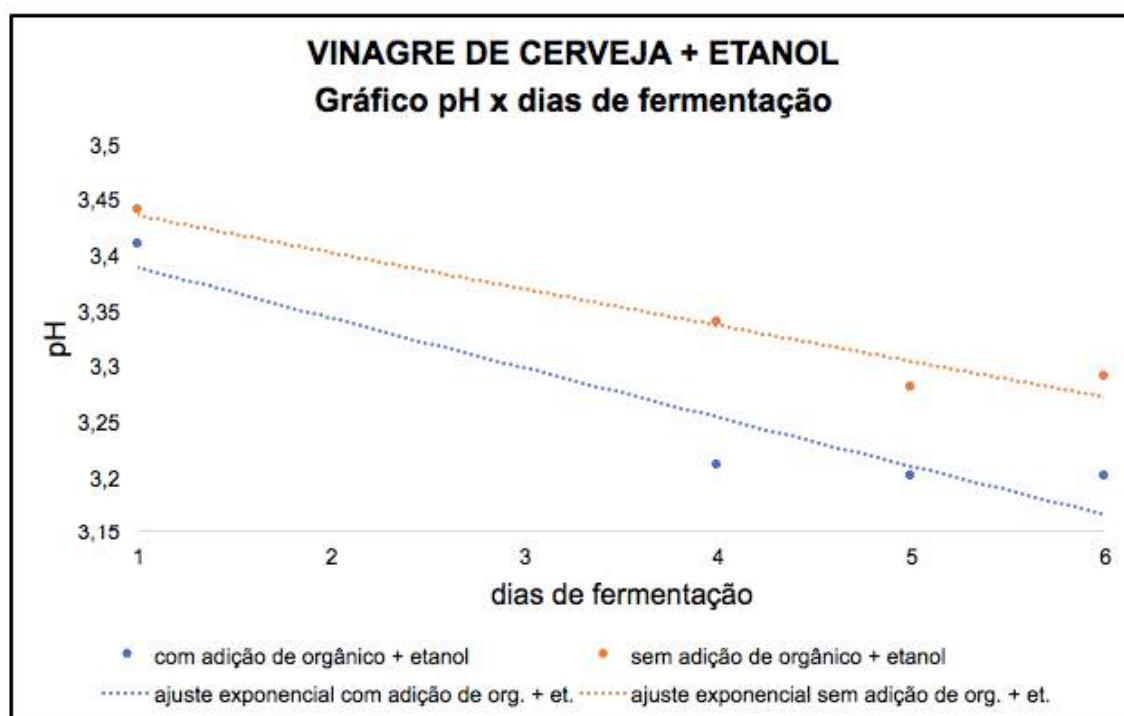
Tabela 2 – Dados obtidos de pH, temperatura e densidade óptica para vinagre de cerveja + etanol.

Dia	Com adição de orgânico			Sem adição de orgânico		
	pH	T (°C)	D.O	pH	T (°C)	D.O
1	3,41	23	2,324	3,44	23	2,040
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	3,21	22	2,524	3,34	22	2,240
5	3,20	22	2,558	3,28	22	2,320
6	3,20	22	2,613	3,29	22	2,352

Legenda: T: temperatura (em graus Celsius); D.O: densidade óptica.

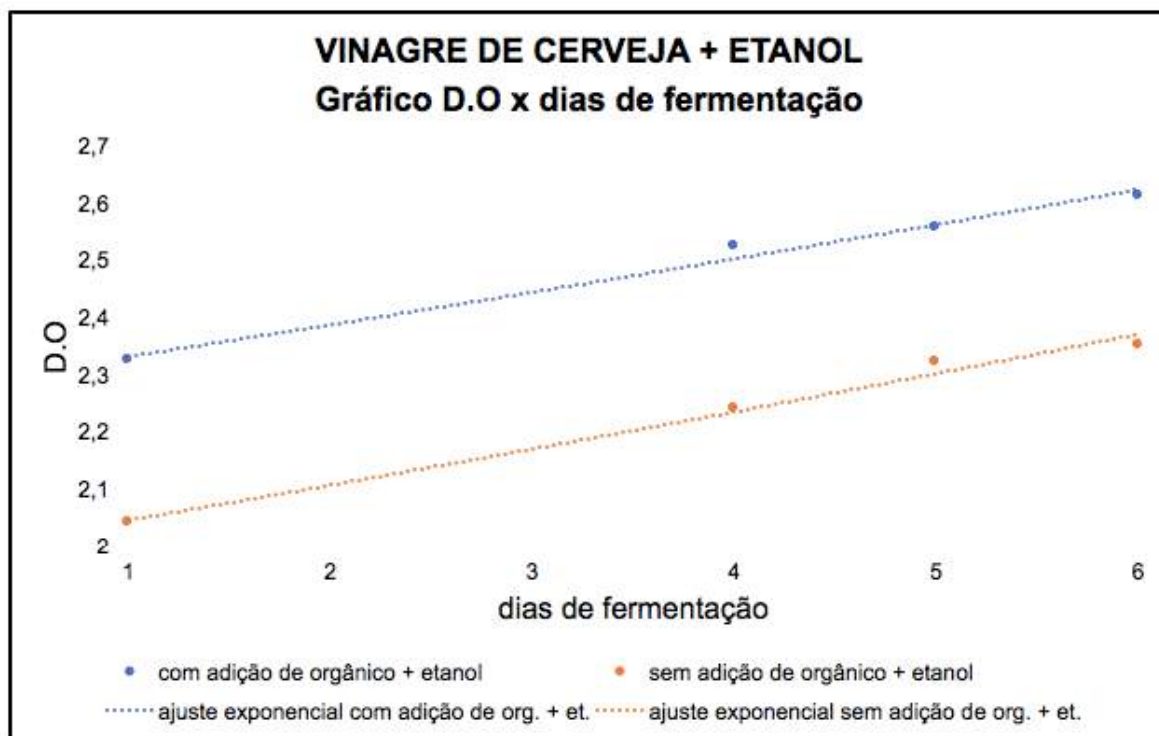
As Figuras 16 e 17 apresentam os dados da Tabela 2, na forma de gráficos. Neles estão os valores de pH e D.O, obtidos em função dos dias de fermentação do vinagre de cerveja depois de acrescentar etanol. Nesse caso, também foram realizados ajustes exponenciais para ambos os parâmetros, em todo o período, já que os microrganismos continuaram crescendo em sua fase exponencial.

Figura 16 – Gráfico pH ao longo dos dias de fermentação do vinagre de cerveja + etanol.



Fonte: A Autora, 2023.

Figura 17 – Gráfico D.O ao longo dos dias de fermentação do vinagre de cerveja + etanol.



Fonte: A Autora, 2023.

Pela análise dos gráficos, da mesma forma que o vinagre de cerveja, o sistema vinagre de cerveja + etanol também apresentou diminuição do pH e aumento da D.O, significando que a fermentação acética se prolongou mais alguns dias pela adição de substrato, o etanol.

Para este caso, a temperatura também se manteve aproximadamente constante em 22 °C. Ao final, o produto com adição de orgânico apresentou um pH de 3,20 e uma densidade óptica de 2,613. Já o produto sem adição de orgânico teve um pH de 3,29 e uma densidade óptica de 2,352.

5.2.2 Análises físico-químicas finais: densidade, acidez total e acidez volátil

Além dos resultados diários de pH, temperatura e densidade óptica já apresentados, após o término da fermentação, também foram obtidos resultados para a densidade, acidez total e acidez volátil do produto final. Como foi necessário preparar uma solução padrão de NaOH para as titulações, foi obtida sua concentração real a partir da descrição do item 5.2.2.1.

5.2.2.1 Padronização da solução de NaOH 0,1 M

Conforme descrito no item 4.4.5.1, foram pesadas determinadas quantidades de hidróxido de sódio e ácido oxálico, próximas de 1 g e 0,3152 g, respectivamente. A Tabela 3 mostra os valores das massas desses componentes.

Tabela 3 – Dados obtidos de massa de hidróxido de sódio e ácido oxálico.

Reagente	NaOH	Ácido oxálico
m (g)	1,0884	0,3158

Legenda: m: massa (g).

Como foi preparada uma solução de NaOH, foi preciso determinar sua real concentração, uma vez que este reagente não é padrão primário e é altamente higroscópico. Para isso, se utilizou do ácido oxálico como padrão primário, que possui um alto grau de pureza, sendo possível conhecer sua concentração exata. Com as Equações 4 e 5 do item 1.5.3 foi possível realizar os cálculos a seguir. A quantidade de ácido oxálico pesada, em mols, é igual a,

$$0,3158g \times 1 \text{ mol} / 126,07 \text{ g} = 2,5049 \times 10^{-3} \text{ molác. oxálico}$$

Seguindo a proporção estequiométrica da reação de 2 mol NaOH : 1 mol ác. oxálico, tem-se o número de mols de hidróxido de sódio necessários para neutralização,

$$2,5049 \times 10^{-3} \text{ molác. oxálico} \times 2 \text{ mol NaOH} / 1 \text{ molác. oxálico} = 5,0098 \times 10^{-3} \text{ mol NaOH}$$

Na titulação, foi utilizado um volume de NaOH de 48,3 mL. Assim, pode-se determinar a concentração real desse reagente,

$$5,0098 \times 10^{-3} \text{ mol NaOH} / 48,3 \text{ mL} \times 1000 \text{ mL} / 1 \text{ L} = 0,1037 \text{ mol/L NaOH}$$

Então, conclui-se a padronização da solução de NaOH, a partir do cálculo de sua concentração igual a 0,1037 mol/L.

5.2.2.2 Densidade

A Tabela 4 apresenta os valores de massa obtidos após a pesagem do picnômetro contendo água destilada e vinagre de cerveja (com e sem adição de orgânico).

Tabela 4 – Dados obtidos de massa para os conjuntos de picnômetro com diferentes substâncias.

Conjunto	Picnômetro + água destilada	Picnômetro + vinagre (com adição de org.)	Picnômetro + vinagre (sem adição de org.)
m (g)	31,9450	32,1575	32,1514

Legenda: m: massa (g).

A massa do picnômetro vazio obtida foi de 21,2419 g, logo, pode-se determinar as massas apenas dos conteúdos,

$$31,9450g - 21,2419g = 10,7031g_{\text{água destilada}}$$

$$32,1575g - 21,2419g = 10,9156g_{\text{vinagre com adição de org.}}$$

$$32,1514g - 21,2419g = 10,9095g_{\text{vinagre sem adição de org.}}$$

Sendo o picnômetro de 10 mL, é possível calcular a densidade da água destilada na temperatura de análise, a 22,5 °C, dividindo sua massa pelo respectivo volume (Equação 2 do item 1.5.2), sendo esse valor igual a 1,0703 g/mL. Pode-se obter, então, as densidades relativas dos vinagres, a partir da razão de suas densidades em relação à da água pura (Equação 3 do item 1.5.2). Essas informações estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Densidades relativas para as substâncias analisadas.

Substância	Vinagre com adição de orgânico	Vinagre sem adição de orgânico
D.R	1,0198	1,0193

Legenda: D.R: densidade relativa (densidade da substância/densidade da água pura a 22,5 °C)

Analisando os resultados obtidos, nota-se que os vinagres apresentaram densidades relativas com uma diferença na quarta casa decimal, o que demonstra que as substâncias são semelhantes quanto à densidade. Também é perceptível que ambos são mais densos do que a água pura, uma vez que $D.R > 1$.

5.2.2.3 Acidez total

A Tabela 6 apresenta os volumes da solução padrão de NaOH, gastos nas duas titulações dos vinagres, conforme o procedimento descrito no item 4.4.5.2.

Tabela 6 – Dados obtidos de volume de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação do vinagre.

Titulação do vinagre	Com adição de orgânico	Sem adição de orgânico
V NaOH (mL)	33,5	25,0

Legenda: V NaOH: volume de hidróxido de sódio (mL).

Também utilizando as Equações 4 e 5 do item 1.5.3, foi possível realizar os cálculos a seguir. Como a concentração real de NaOH na solução padrão é de 0,1037 mol/L, nesses volumes a quantidade de reagente é igual a,

Com adição de orgânico:

$$33,5\text{mL} \times 0,1037\text{ mol/L} \times 1\text{ L}/1000\text{ mL} = 3,4739 \times 10^{-3}\text{ mol NaOH}$$

Sem adição de orgânico:

$$25,0\text{mL} \times 0,1037\text{ mol/L} \times 1\text{ L}/1000\text{ mL} = 2,5925 \times 10^{-3}\text{ mol NaOH}$$

Existem diversas substâncias no meio, provenientes da matéria bruta e das vias metabólicas dos microrganismos. Essas substâncias são o ácido acético e o ácido láctico do metabolismo de bactérias, o ácido málico da maçã, utilizada para a obtenção da mãe do vinagre, o ácido cítrico presente naturalmente na cerveja originada das leveduras, entre outros. Há ainda compostos orgânicos como os fenóis que podem atuar com uma capacidade de tamponamento do meio. Dessa forma, mais análises deveriam ser realizadas para se determinar com exatidão a substância responsável pela maior parte da acidez total. Será considerado o ácido láctico como um indicador do metabolismo dos microrganismos neste cálculo.

Como a proporção estequiométrica é de 1 mol NaOH : 1 mol ác. láctico, tem-se que o número de mols de ác. láctico necessários para neutralização é igual ao número de mols de NaOH,

Com adição de orgânico:

$$3,4739 \times 10^{-3}\text{ mol NaOH} \times 1\text{ mol ác. láctico}/1\text{ mol NaOH} = 3,4739 \times 10^{-3}\text{ mol ác. láctico}$$

Sem adição de orgânico:

$$2,5925 \times 10^{-3}\text{ mol NaOH} \times 1\text{ mol ác. láctico}/1\text{ mol NaOH} = 2,5925 \times 10^{-3}\text{ mol ác. láctico}$$

Como a massa molar do ácido láctico é de 90,08 g/mol, a quantidade em gramas é igual a,

Com adição de orgânico:

$$3,4739 \times 10^{-3}\text{ mol ác. láctico} \times 90,08\text{ g/mol} = 0,3129\text{ g ác. láctico}$$

Sem adição de orgânico:

$$2,5925 \times 10^{-3}\text{ mol ác. láctico} \times 90,08\text{ g/mol} = 0,2335\text{ g ác. láctico}$$

Como foi utilizada uma alíquota de vinagre de 10 mL, segundo o item 4.4.5.2, é possível determinar a acidez total para ambos os vinagres,

Com adição de orgânico:

$$0,3129 \text{ gác. lático} / 10 \text{ mL} \rightarrow 3,129 \text{ gác. lático} / 100 \text{ mL}$$

Sem adição de orgânico:

$$0,2335 \text{ gác. lático} / 10 \text{ mL} \rightarrow 2,335 \text{ gác. lático} / 100 \text{ mL}$$

A Tabela 7 apresenta os resultados de acidez total obtidos para ambas as variações de vinagre.

Tabela 7 – Acidez total para os vinagres com e sem adição de orgânico.

Atotal	Com adição de orgânico	Sem adição de orgânico
g/100 mL	3,129	2,335

Legenda: Atotal: acidez total (g/100 mL).

Dessa forma, o produto final com adição de orgânico apresentou uma acidez total de 3,129 g/100 mL. Já o produto sem adição de orgânico mostrou uma acidez total de 2,335 g/100 mL.

5.2.2.4 Acidez volátil

Após a realização da destilação por arraste a vapor dos produtos (com e sem adição de orgânico), conforme descrito no item 4.4.6.1, obteve-se os seguintes volumes de destilados (Tabela 8).

Tabela 8 – Dados obtidos de volume de destilado de vinagre de cerveja.

Destilado do vinagre	Com adição de orgânico	Sem adição de orgânico
V (mL)	118	116

Legenda: V: volume (mL).

Nota-se que, em ambos os casos, foram coletados pelo menos 100 mL de destilado, conforme recomendação da metodologia (ZENEBO et. al., 2008). Desta forma, foi possível garantir que houve a coleta de praticamente todo o ácido acético da alíquota de vinagre.

A partir dos destilados obtidos, foram executadas as titulações, conforme item 4.4.6.2, utilizando a solução padrão de NaOH que foi preparada anteriormente. A

Tabela 9 mostra os volumes da solução de hidróxido de sódio que foram gastos nas duas titulações.

Tabela 9 – Dados obtidos de volume de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação dos destilados.

Titulação do destilado do vinagre	Com adição de orgânico	Sem adição de orgânico
V NaOH (mL)	4,5	2,4

Legenda: V NaOH: volume de hidróxido de sódio (mL).

Os cálculos são análogos aos do item 5.2.2.3. Como a concentração real de NaOH na solução padrão é de 0,1037 mol/L, tem-se nesses volumes uma quantidade de reagente igual a,

Com adição de orgânico:

$$4,5\text{mL} \times 0,1037\text{ mol/L} \times 1\text{ L}/1000\text{ mL} = 4,6665 \times 10^{-4}\text{ mol NaOH}$$

Sem adição de orgânico:

$$2,4\text{mL} \times 0,1037\text{ mol/L} \times 1\text{ L}/1000\text{ mL} = 2,4888 \times 10^{-4}\text{ mol NaOH}$$

Seguindo a proporção estequiométrica da reação de 1 mol NaOH : 1 mol ác. acético, tem-se que o número de mols de ác. acético necessários para neutralização é igual ao número de mols de NaOH,

Com adição de orgânico:

$$4,6665 \times 10^{-4}\text{ mol NaOH} \times 1\text{ mol ác. acético}/1\text{ mol NaOH} = 4,6665 \times 10^{-4}\text{ mol ác. acético}$$

Sem adição de orgânico:

$$2,4888 \times 10^{-4}\text{ mol NaOH} \times 1\text{ mol ác. acético}/1\text{ mol NaOH} = 2,4888 \times 10^{-4}\text{ mol ác. acético}$$

Como a massa molar do ácido acético é de 60,05 g/mol, a quantidade em gramas é igual a,

Com adição de orgânico:

$$4,6665 \times 10^{-4}\text{ mol ác. acético} \times 60,05\text{ g/mol} = 0,0280\text{ g ác. acético}$$

Sem adição de orgânico:

$$2,4888 \times 10^{-4}\text{ mol ác. acético} \times 60,05\text{ g/mol} = 0,0149\text{ g ác. acético}$$

Essa quantidade é referente ao volume de vinagre utilizado inicialmente (10 mL, segundo item 4.4.6.1). Assim sendo, é possível calcular a acidez volátil,

Com adição de orgânico:

$$0,0280\text{ g ác. acético}/10\text{ mL} \rightarrow 0,280\text{ g ác. acético}/100\text{ mL}$$

Sem adição de orgânico:

$$0,0149g_{\text{ác. acético}}/10\text{ mL} \rightarrow 0,149g_{\text{ác. acético}}/100\text{ mL}$$

A Tabela 10 apresenta os resultados de acidez volátil obtidos para ambas as variações de vinagre.

Tabela 10 – Acidez volátil para os vinagres com e sem adição de orgânico.

Avolátil	Com adição de orgânico	Sem adição de orgânico
g/100 mL	0,280	0,149

Legenda: Avolátil: acidez volátil (g/100 mL).

Então, o produto final com adição de orgânico apresentou uma acidez volátil de 0,280 g/100 mL, enquanto o produto sem adição de orgânico mostrou uma acidez volátil de 0,149 g/100 mL. De acordo com a legislação brasileira (ANAV, 2012), em fermentados acéticos, o teor mínimo de acidez volátil em ácido acético é de 4,00 g/100 mL. Ou seja, nesse caso, não foi produzido um fermentado acético segundo as normas regulamentadoras para comercialização. Porém, foi obtido um produto final com as devidas características sensoriais esperadas.

Os cálculos realizados e as análises de evolução de pH e densidade óptica demonstram que houve a formação de ácido acético pelos microrganismos, porém, em uma quantidade menor do que o esperado. O aumento significativo da densidade óptica, já relatado anteriormente, mostra que houve uma grande formação de massa celular.

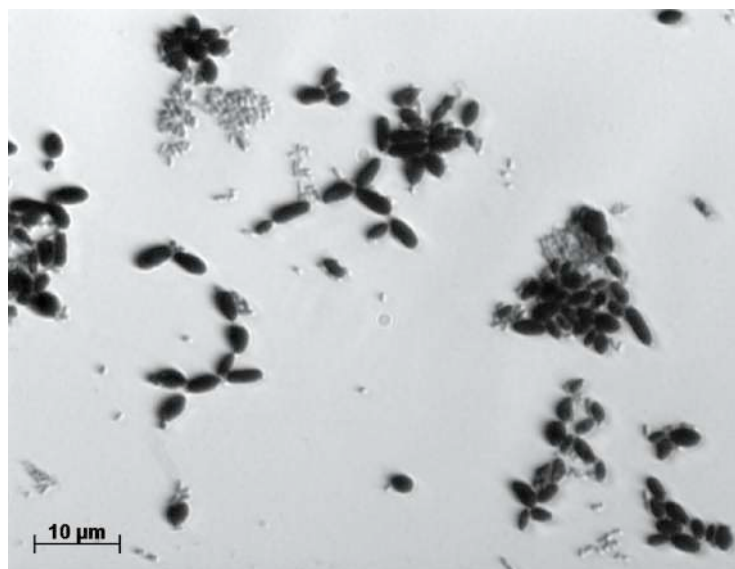
A fermentação gerou uma variação percentual de pH, em números absolutos, de 15,34% e 14,10%, para os vinagres com e sem adição de orgânico, respectivamente. Já a variação percentual de D.O, foi de 87,85% e 80,37%, para os vinagres com e sem adição de orgânico, respectivamente. Assim, é possível notar que a variação de pH foi significativamente menor do que a variação de D.O.

Como o processo fermentativo continuou pela adição posterior de etanol, provavelmente, a quantidade inicial de substrato não foi suficiente para produzir um vinagre com teor de acidez adequado para comercialização. Além disso, uma vez que o procedimento não foi realizado seguindo condições estéreis e controladas como em um laboratório de microbiologia, e a cultura inoculada não foi selecionada previamente, é possível que outras culturas tenham se desenvolvido no meio, produzindo compostos diferentes segundo vias metabólicas distintas.

5.2.3 Análise microbiológica

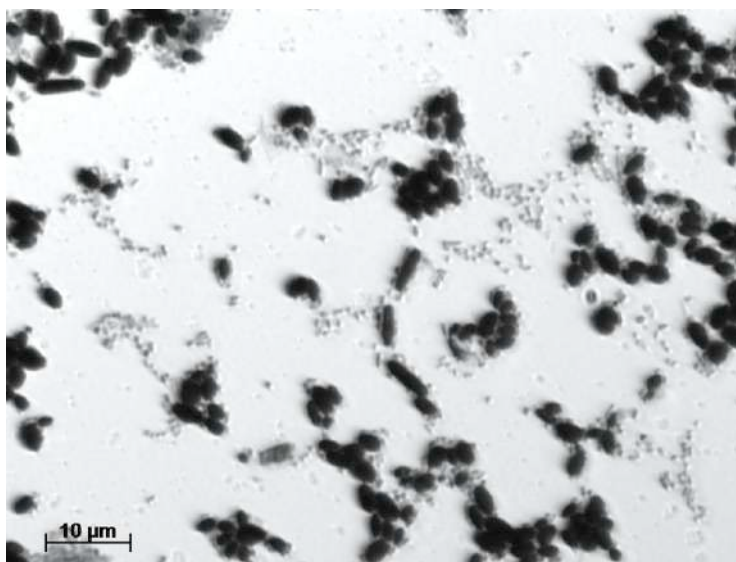
As Figura 18 e 19 mostram os registros das lâminas de vinagre de cerveja com e sem adição de orgânico, respectivamente, vistas ao microscópio óptico.

Figura 18 – Registro do vinagre de cerveja com adição de orgânico ao microscópio óptico.



Fonte: A Autora, 2023.

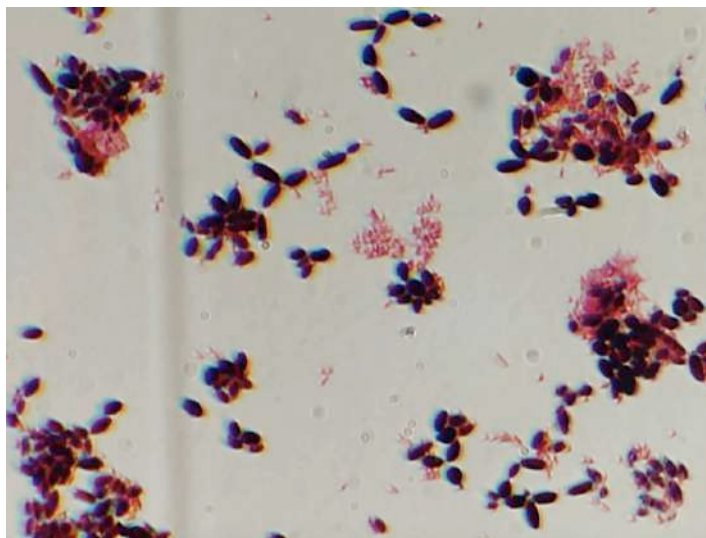
Figura 19 – Registro do vinagre de cerveja sem adição de orgânico ao microscópio óptico.



Fonte: A Autora, 2023.

A Figura 20 apresenta uma fotografia da lente do microscópio, na qual é possível visualizar a coloração de Gram dos microrganismos.

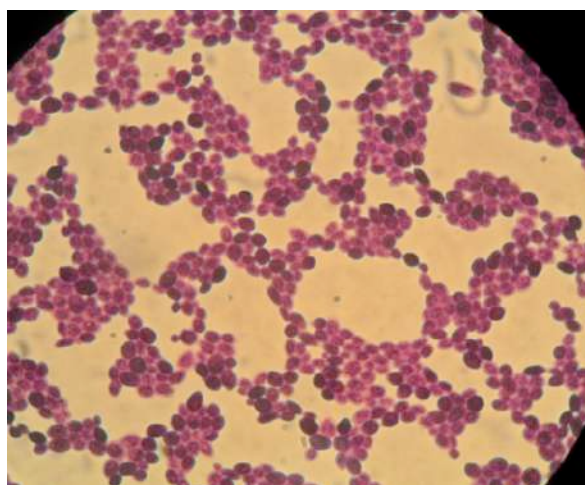
Figura 20 – Fotografia do vinagre de cerveja ao microscópio óptico.



Fonte: A Autora, 2023.

Analisando os resultados, percebe-se que em ambos os casos houve o desenvolvimento de duas culturas, uma Gram-positiva e uma Gram-negativa, em quantidades aproximadamente equivalentes. A cultura de microrganismos Gram-positivos adquiriu coloração violeta após a técnica de coloração de Gram, realizada segundo o item 4.5. Esta é de tamanho significativamente maior do que a outra cultura, e sugere ser de leveduras que se encontravam no meio, provenientes da cerveja ou dos processos intermediários na produção do vinagre. A Figura 21 mostra uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* vista ao microscópio óptico após a coloração de Gram, morfológicamente próximo ao que foi visualizado no vinagre.

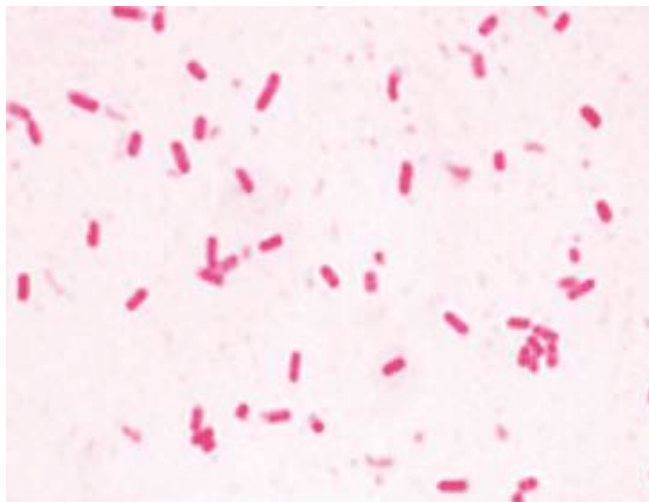
Figura 21 – Cultura de *Saccharomyces cerevisiae* ao microscópio óptico.



Fonte: Pontificia Universidad Javeriana, 2019.

Já a cultura de coloração rosa é característica de microrganismos Gram-negativos, o que é compatível com *Acetobacter* (Figura 22), as bactérias responsáveis pela produção de ácido acético.

Figura 22 – Cultura de *Acetobacter* ao microscópio óptico.



Fonte: Instruments Direct Services, 2023.

Dessa forma, pode ser constatado que houve um crescimento simultâneo de duas espécies de microrganismos. Assim sendo, ambos cresceram em um meio com uma competitividade por substrato para garantir sua sobrevivência, o que justifica a pequena quantidade de ácido acético produzido pelas bactérias acéticas, ao final do experimento.

5.3 Comparação: com x sem adição de vinagre orgânico

A partir dos resultados obtidos, percebe-se que a diferença entre os vinagres com e sem adição de orgânico no início do processo foi em sua maior parte em relação à acidez total e volátil.

Quanto ao pH e à densidade óptica, o primeiro apresentou menor pH e maior densidade óptica (3,20 e 2,613) em relação ao segundo (3,29 e 2,352). Ambos apresentaram densidades relativas praticamente iguais, com diferença na quarta casa decimal (1,0198 e 1,0193, respectivamente). A acidez total foi maior para o vinagre com adição de orgânico (3,129 g/100 mL) em relação ao sem adição de orgânico (2,335 g/100 mL). O mesmo para a acidez volátil (0,280 g/100 mL e 0,149 g/100 mL, respectivamente).

Em resumo, o vinagre com orgânico apresentou uma maior densidade óptica e um menor pH em comparação ao sem orgânico.

6. CONCLUSÃO

Analisando os resultados, percebe-se que as condições do processo geraram um desvio da produção de vinagre de cerveja. Houve a formação de uma quantidade pequena de ácido acético, não sendo suficiente para atender as especificações da legislação brasileira. A adição de vinagre orgânico ao processo apresentou maior relevância quanto a acidez total e a acidez volátil, as quais se mostraram superiores. É provável que o desvio tenha sido devido ao crescimento de outra cultura no meio, assim como a utilização de pouco substrato.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho pode ser base para analisar as condições ideais de um processo de produção de vinagre de cerveja, porém, mais análises são necessárias para dar seguimento ao estudo.

Como alternativas de procedimento para análises posteriores, poderia ser utilizada uma cultura pura e isolada de *Acetobacter* e a manipulação do produto em ambiente estéril dentro de capelas de fluxo laminar. Dessa forma, se evitaria ao máximo a contaminação por outras culturas e o microrganismo poderia ter acesso exclusivo ao substrato para seu desenvolvimento.

Além disso, também poderia ser utilizada uma cerveja com maior teor alcoólico (superior a 5% e inferior a 15%), uma vez que teria maior quantidade de etanol disponível para as bactérias acéticas, e conseqüentemente a produção de ácido acético seria maior. Poderia ser utilizada uma cerveja do tipo "Ale", como uma IPA, para ter um meio com maior quantidade de etanol disponível, ou ainda uma cerveja "viva", que contém microrganismos.

Quanto aos procedimentos realizados, poderiam ser realizadas medidas de D.O após centrifugação das amostras, em um comprimento de onda diferente (para 600 nm, que é normalmente utilizada para medir concentração celular), ou ainda realizar diluição das amostras a fim de respeitar a linearidade do equipamento.

Ainda, pode-se pesquisar a produção de vinagres de cerveja por meio de culturas consorciadas de leveduras *Saccharomyces/Brettanomyces* em condições adequadas de aeração.

REFERÊNCIAS

Acetic Acid: Biosynthesis and Fermentation Process. BIOTECHNOLOGY NOTES, 2018. Disponível em: <www.biotechnologynotes.com/industrial-biotechnology/acetate-acid/acetate-acid-biosynthesis-and-fermentation-process-industries-biotechnology/13778#google_vignette>. Acesso em: 07 ago. 2023.

ALST, A. J. V.; LEVEQUE, R. M.; MARTIN, N.; DIRITA, V. J. **Growth Curves: Generating growth curves using colony forming units and optical density measurements.** JOVE SCIENCE EDUCATION, 2023. Disponível em: <www.jove.com/v/10511/growth-curves-generating-growth-curves-using-colony-forming-units?language=Portuguese#:~:text=A%20densidade%20%C3%B3ptica%20%C3%A9%20uma,que%20a%20densidade%20bacteriana%20aumenta>. Acesso em: 08 ago. 2023.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos.** São Paulo: Blucher, 2001, v. 4.

BARBOSA, J. **Queijos: um pouco de história.** FOOD SAFETY BRAZIL, 2021. Disponível em: <foodsafetybrazil.org/queijos-um-pouco-de-historia/>. Acesso em: 12 nov. 2022.

Conservação de alimentos: entenda seu surgimento e evolução. GEPEA, 2019. Disponível em: <gepea.com.br/conservacao-de-alimentos/#:~:text=Evolu%C3%A7%C3%A3o%20das%20t%C3%A9cnicas%20de%20conserva%C3%A7%C3%A3o%20de%20alimentos&text=J%C3%A1%20na%20Idade%20Antiga%2C%20foram,para%20a%20conserva%C3%A7%C3%A3o%20da%20carne>. Acesso em: 12 nov. 2022.

CRUZ, S. H. **Processos Fermentativos.** ESALQ, USP, 2016. Disponível em: <edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2203718/mod_resource/content/1/2016%20Processos%20Fermentativos%202.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2023.

D'AQUINO, F. **Lambic, a "mãe das cervejas".** CLUBE DO MALTE, 2020. Disponível em: <www.clubedomalte.com.br/blog/estilos-de-cerveja/lambic-a-mae-das-cervejas/>. Acesso em: 12 nov. 2022.

FOGAÇA, J. **Conceito de pH.** MANUAL DA QUÍMICA, 2023. Disponível em: <www.manualdaquimica.com/fisico-quimica/conceito-ph.htm>. Acesso em: 07 ago. 2023.

Glycolysis. CK-12, 2023. Disponível em: <www.ck12.org/c/biology/glycolysis/lesson/Glycolysis-BIO/?referrer=featured_content>. Acesso em: 24 jul. 2023.

How to make a vinegar mother. PRESERVE & PICKLE, 2019. Disponível em: <preserveandpickle.com/how-to-make-a-vinegar-mother>. Acesso em: 07 ago. 2023.

KAYOKO TAKEDA. **O vinagre de maçã caseiro que qualquer pessoa consegue fazer.** YouTube, 2022. Disponível em: <www.youtube.com/watch?v=maM-qXZDySc>. Acesso em: 14 abr. 2022.

Lager e Ale, você sabe a diferença entre elas? ALBANOS, 2020. Disponível em: <<https://albanos.com.br/lager-e-ale-diferencas/>>. Acesso em: 15 nov. 2022.

Legislação Instrução Normativa Número 6. ANAV, 2012. Disponível em: <www.anav.com.br/legislacao.php?id=29>. Acesso em: 20 set. 2022.

LIMA, A. L. L. **Densidade.** MUNDO EDUCAÇÃO, UOL, 2023. Disponível em: <mundoeducacao.uol.com.br/quimica/densidade.htm>. Acesso em: 20 ago. 2023.

Madre mãe do vinagre. GLOBO, 2015. Disponível em: <receitas.globo.com/receitas-da-tv/mais-voce/madre-mae-do-vinagre-53341d194d38856ba500003f.ghtml>. Acesso em: 14 abr. 2022.

MARKHAM, B. L. **The Mini Farming Guide to Fermenting: Self-sufficiency from beer and cheese to wine and vinegar.** New York: Skyhorse Publishing, 2012.

MATOS, M. A. C. **Introdução à Titulação.** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, 2019. Disponível em: <www2.ufjf.br/nupis/files/2011/08/Aula-3-Introdu%c3%a7%c3%a3o-Titula%c3%a7%c3%a3o-QUI-094-2019-1-NUPIs.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2023.

MORADO, R. **Larousse da cerveja: a história e as curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo.** São Paulo: Alaúde, 2017.

RIZZON, L. A. **Sistema de Produção de Vinagre.** EMBRAPA, 2006. Disponível em: <sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/fermentacao.htm>. Acesso em: 08 ago. 2023.

ROCHA, D. **Fermentados.** Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Análises e Pesquisas de Bebidas Alcoólicas, 2016. Disponível em: <www.ct.ufpb.br/lba/contents/menu/pesquisas/vinagre>. Acesso em: 07 ago. 2023.

Saccharomyces cerevisiae. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, 2019. Disponível em: <archive.org/details/sdc18364/SDC18364.JPG>. Acesso em: 23 dez. 2023.

STEINMEYER, K. **Types of Beer: A complete guide.** HOME BREW ACADEMY, 2022. Disponível em: <<https://homebrewacademy.com/types-of-beer/>>. Acesso em: 12 nov. 2022.

What's the difference between Lager and Ale? HOPSMORE, 2022. Disponível em: <<https://hopsmore.co.uk/blogs/beer-blog/ale-vs-lager#:~:text=Well%2C%20it's%20an%20interesting%20question,are%20a%20few%20big%20differences.&text=Ales%20tend%20to%20ferment%20at,roughly%2042%2D55%20f%20>>. Acesso em: 15 nov. 2022.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.