



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**



---

**Centro de Ciências Agrárias  
Depto. De Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos**

**TATIELE BORGES PEREIRA**

**ANÁLISES INSTRUMENTAIS PARA A DETECÇÃO DE  
FRAUDE EM VINAGRES DE MAÇÃ: ESTUDO  
EXPLORATÓRIO**

---

Londrina

2021

**TATIELE BORGES PEREIRA**

**ANÁLISES INSTRUMENTAIS PARA A DETECÇÃO DE  
FRAUDE EM VINAGRES DE MAÇÃ: ESTUDO  
EXPLORATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa

Coorientadora: Dra. Fernanda Carla Henrique Bana

Londrina

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

P436 Pereira, Tatielle.  
Análises instrumentais para a detecção de fraude em vinagres de maçã: estudo exploratório / Tatielle Pereira. - Londrina, 2021.  
108 f. : il.

Orientador: Wilma Spinosa.  
Coorientador: Fernanda Bana.  
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Fraude em vinagre - Tese. 2. Métodos instrumentais - Tese. I. Spinosa, Wilma. II. Bana, Fernanda. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.1

**TATIELE BORGES PEREIRA**

**ANÁLISES INSTRUMENTAIS PARA A DETECÇÃO DE  
FRAUDE EM VINAGRES DE MAÇÃ: ESTUDO  
EXPLORATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Profa. Dra. Wilma A. Spinosa  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Leticia Fleury Viana  
Instituto Federal Goiano

---

Profa. Dra. Rhavena Graziela Liotti  
Instituto Federal de Mato Grosso

Londrina, 23 de julho de 2021.

## **AGRADECIMENTOS**

À família.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Wilma Spinosa e à Dr<sup>ª</sup> Fernanda Henrique Bana pela orientação e coorientação nesse trabalho.

Ao Dr. Thiago Inácio Barros Lopes pela disponibilidade e conhecimentos compartilhados para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Luiz Diego Marestoni pelas análises de CLUE.

A todos os colegas do programa que sempre se dispuseram a me auxiliar prontamente, contribuindo de forma efetiva para a minha formação.

Ao Laboratório de Espectroscopia da Central Multiusuária da PROPPG pela realização de análises e disponibilização de equipamentos fundamentais.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos os demais envolvidos direta ou indiretamente na elaboração e conclusão desse projeto.

## RESUMO

PEREIRA, Tatiele Borges. **Análises instrumentais para a detecção de fraude em vinagres de maçã: estudo exploratório**. 2021. 106 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

Casos de fraude em alimentos não são uma exclusividade do mundo moderno, porém, por sua capacidade de causar prejuízo econômico e devido à complexidade de detecção, têm se tornado cada vez mais objeto de estudo da área. Entre os alimentos vulneráveis à adulteração, o vinagre se destaca no desafio da detecção de fraude, pela complexidade química dos compostos gerados na fermentação. Práticas de adição de insumos de menor preço, ao vinagre de maçã, colocam em risco a integridade do produto comercializada no Brasil. Diante desse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar amostras de vinagre de maçã por métodos instrumentais para detecção de possíveis fraudes. Amostras de vinagre de maçã de 5 marcas foram adquiridas no comércio regional, denominadas de amostras comerciais, e analisadas juntamente com 2 amostras de referência quanto à acidez total, volátil e fixa, álcool, cinzas, extrato seco reduzido, e sulfatos; seguidas das análises por espectroscopia UV-vis e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), além do desenvolvimento de modelos quimiométricos exploratórios buscando a detecção de fraudes. Por fim, para obtenção de seus teores, foi realizada a quantificação de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Para as análises instrumentais foram adicionadas 13 amostras, entre vinagres de maçã e vinagres de álcool, para adequada comparação. Paralelamente, foi aplicado um questionário online para avaliação do conhecimento dos consumidores em relação à qualidade e fraudes em vinagre. As amostras comerciais apresentaram perfil físico-químico dentro dos limites estabelecidos em legislação. A análise de UV-vis identificou uma tendência de agrupamento dos diferentes tipos de vinagre, porém não foi capaz de estabelecer uma classificação precisa. Por sua vez, os dados de  $^1\text{H}$ -RMN diferenciaram as amostras de vinagre de maçã das amostras de vinagre de álcool e estabeleceram um perfil intermediário para as amostras fraudadas. Os teores de ácido láctico e acético quantificados por CLUE confirmaram a informação previamente fornecida nos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, entretanto, uma avaliação isolada desses ácidos não contribuiu para a identificação de fraude nesses vinagres. A pesquisa de campo indicou que a

maior parte dos consumidores não está familiarizada com a possibilidade de fraudes no vinagre. O presente trabalho, explorou técnicas não-direcionadas, de rápida e simplificada execução e abre o caminho para futuras pesquisas relacionadas à fraude em produtos fermentados no Brasil. O aperfeiçoamento dos métodos aqui empregados, poderá viabilizar e propagar essas técnicas à cadeia produtora, e por sua vez beneficiar diretamente o consumidor.

**Palavras-chave:** adulteração; fermentado acético; impressão digital; testes não direcionados.

## ABSTRACT

PEREIRA, Tatiele Borges. **Instrumental analyzes as a tool to identify fraud in apple vinegar: exploratory study**. 2021. 106 p. Dissertation (Masters degree in Food Science) – Center of Agrarian Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

Food fraud events are no longer news, however due to the economic loss involved and the complexity of detection, they have become increasingly studied. Among the foods vulnerable to adulteration, vinegar stands out in the challenge of fraud detection, owing to the chemical complexity generated in fermentation process. The addition of lower-priced inputs to apple vinegar puts the integrity of the product sold in Brazil at risk. Thus, the objective of this work was to evaluate apple vinegar samples by instrumental methods to detect possible fraud. Apple vinegar samples from 5 brands were purchased in local market and characterized together with 2 reference samples regarding total, volatile and fixed acidity, alcohol, ash, reduced dry extract, and sulfates; followed by UV-vis spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR), besides the development of exploratory chemometric models seeking to detect fraud. Finally, the quantification of organic acids was performed by Ultra-performance Liquid Chromatography (UPLC) to obtain their levels. 13 new samples, between apple and white vinegar, were included for the instrumental analyses for comparison purposes. In parallel, an online questionnaire was applied to assess the knowledge of the consumers regarding quality and fraud in vinegar. The commercial samples showed a physicochemical profile within the limits established by legislation. The UV-vis analysis identified a trend to group the different types of vinegar, but it was not able to establish a precise classification. Otherwise, the  $^1\text{H-NMR}$  data properly differentiated the apple vinegar samples from the white vinegar samples and established an intermediate profile for the adulterated samples. The lactic and acetic acid contents quantified by UPLC confirmed the information previously provided by  $^1\text{H-NMR}$  spectra, however, an isolated evaluation of these acids did not contribute to the identification of fraud in these vinegars. Lastly, the questionnaire indicated that most consumers are not familiar with fraud in vinegar. The present work, explored non-targeted techniques, of fast and simplified execution and paved the way for future researches related to food fraud in Brazil. The improvement of the methods used here, can enable and spread these techniques to the production chain, and in turn directly benefit the consumer.

**Keywords:** adulteration; acetic fermentation; spectralprint; non-targeted.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esboço do fluxograma de fermentação do vinagre .....	18
<b>Figura 2:</b> Classificação e denominação do vinagre .....	20
<b>Figura 3:</b> Parâmetros do fermentado acético no Brasil .....	22
<b>Figura 4:</b> Visão esquemática dos estágios da análise não direcionada. ....	32
<b>Figura 5:</b> Espectros UV-vis das amostras estudadas na região espectral de 200 a 800 nm. ....	51
<b>Figura 6:</b> Gráfico de escore do modelo ACP para os dados UV-vis.....	52
<b>Figura 7:</b> Gráfico de pesos do modelo ACP para os dados UV-vis .....	52
<b>Figura 8:</b> Espectros RMN de $^1\text{H}$ das amostras de vinagre de maçã, álcool e fraudada. ....	54
<b>Figura 9:</b> Gráfico de escore do modelo ACP para os dados de RMN de $^1\text{H}$ .....	56
<b>Figura 10:</b> Gráfico de pesos do modelo ACP para os dados de RMN de $^1\text{H}$ .....	56
<b>Figura 11:</b> Cromatograma de uma amostra de vinagre de álcool.....	59
<b>Figura 12:</b> Cromatograma de uma amostra de vinagre de maçã .....	60
<b>Figura 13:</b> Caracterização dos participantes da pesquisa .....	63
<b>Figura 14:</b> Dados de consumo de vinagre no Brasil .....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição do vinagre de maçã.....	24
<b>Tabela 2:</b> Identificação das amostras de vinagre de maçã comerciais e as referências estudadas.....	37
<b>Tabela 3:</b> Identificação das amostras adicionais de vinagre de álcool .....	38
<b>Tabela 4:</b> Identificação das amostras adicionais de vinagre de maçã .....	38
<b>Tabela 5:</b> Resultados físico-químico das amostras de vinagre de maçã comerciais e referências estudadas.....	49
<b>Tabela 6:</b> Características dos sinais de $^1\text{H}$ RMN, $\delta$ (deslocamento químico) e J (constante de acoplamento) observável nos vinagres de maçã e álcool estudados.	54
<b>Tabela 7:</b> Estimativa* das concentrações de alguns metabólitos de interesse com base nos espectros de RMN de $^1\text{H}$ . .....	58
<b>Tabela 8:</b> *Ácidos orgânicos quantificados por CLUE nas amostras de vinagre de maçã e álcool estudadas.....	60

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
3.1 VINAGRE .....	16
3.1.1 História do Vinagre .....	16
3.1.2 Processo Produtivo do Vinagre .....	17
3.1.3 Composição do Vinagre .....	20
3.1.4 Vinagre de Maçã .....	23
3.1.5 Valor de Mercado .....	25
3.2. FRAUDE EM ALIMENTOS ( <i>FOOD FRAUD</i> ) .....	26
3.2.1 Fraude em Vinagres .....	29
3.2.2 Métodos para Detecção de Fraudes em Alimentos .....	31
3.2.2.1 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	33
3.2.2.2 Espectroscopia de absorção UV-Vis .....	34
3.2.2.3 Cromatografia Líquida de ultra eficiência (CLUE) .....	35
3.2.2.4 Análise de componentes principais (ACP) .....	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1 AMOSTRAS .....	37
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	38
4.2.1 Acidez Total .....	39
4.2.2 Acidez Fixa .....	39
4.2.3 Acidez Volátil .....	40
4.2.4 Álcool .....	40
4.2.5 Cinzas .....	40
4.2.6 Extrato seco total e reduzido .....	41
4.2.7 Açúcares totais .....	41
4.2.8 Sulfatos .....	43
4.2.9 Análise Estatística .....	43
4.3 ESPECTROSCOPIA UV-VIS .....	43
4.3.1 Preparação das Amostras .....	43

4.3.2	Análise UV-Vis .....	44
4.3.3	Análise Estatística Multivariada .....	44
4.4	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	44
4.4.1	Preparo das Amostras.....	44
4.4.2	RMN de <sup>1</sup> H das Amostras de Vinagre .....	44
4.4.3	Análise Estatística Multivariada.....	45
4.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE) .....	45
4.5.1	Preparo das Amostras.....	45
4.5.2	Análise de CLUE .....	46
4.5.3	Análise Estatística .....	46
4.6	PESQUISA DE CAMPO.....	46
4.6.1	Questionário .....	47
4.6.2	Aplicação do Questionário.....	47
4.6.3	Análise Estatística .....	47
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>48</b>
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	48
5.2	ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS .....	50
5.3	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	53
5.3.1	Estimativa da Concentração Relativa por RMN de <sup>1</sup> H.....	57
5.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE) .....	59
5.5	PESQUISA DE CAMPO.....	63
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>68</b>
7.1	MANUSCRITO .....	69
7.2	INSTRUÇÕES AO AUTOR.....	87
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>104</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O vinagre é caracterizado como um fermentado acético obtido da fermentação acética do fermentado alcoólico do mosto de frutas, cereais ou de outros vegetais, de mel, ou da mistura de vegetais, ou ainda de mistura hidroalcoólica (BRASIL, 2012a). Milenar e mundialmente difundido, o vinagre passou de subproduto obtido pela deterioração do vinho a conservante natural amplamente estudado em virtude de suas atividades funcionais. Ao longo do tempo, não somente sua utilização se transformou, mas também seu processo produtivo (LIM et al., 2019).

Atualmente, o uso de vinagres é amplo e contempla desde a aromatização de pratos, preparo de molhos e condimentação de saladas à conservação através da acidificação dos alimentos. Além disso, o apelo terapêutico com benefícios específicos de acordo com a matéria-prima utilizada em cada vinagre enriquece e estimula o consumo (MAZZA; MUROOKA, 2009).

Nesse sentido, a fabricação artesanal, de longa duração e consequente qualidade superior dos vinagres tradicionais, comercializados em vários países com Denominação de Origem Protegida (DOP), hoje divide mercado com vinagres obtidos a partir de métodos mais rápidos como a fermentação submersa, que visa maior volume de produção devido à crescente demanda (RÍOS-REINA et al., 2019).

A qualidade e o valor econômico do vinagre estão vinculados aos compostos contidos no produto final, originados da matéria-prima ou de etapas específicas do processo de produção. Como exemplo, o vinagre balsâmico de conhecido e amplamente apreciado perfil sensorial, tem um alto valor agregado devido ao longo processo de envelhecimento que lhe concede sabores característicos, e ao apelo de indicação geográfica muito utilizado na Europa, dois critérios chave nos estudos de autenticação de alimentos (CONSONNI; CAGLIANI, 2019).

Como alvo de estudos que buscam comprovar os efeitos de redução da pressão arterial e do colesterol, antidiabético, antiobesidade, antioxidante e antibacteriano, além de seu uso comercial pretendido como ingrediente alimentício, o vinagre de maçã se tornou um alimento terapêutico extremamente

acessível visto seu custo moderado e fácil incorporação à dieta (KAUSAR et al., 2019).

Porém, práticas de adição de vinagre de menor preço, como os vinagres de álcool, ou outros insumos derivados da cana-de-açúcar, como o álcool ou o próprio açúcar, ao vinagre de frutas colocam em risco a qualidade e a identidade da bebida comercializada no Brasil (RIZZON, 2006). O desafio na detecção de fraude é grande, pois os parâmetros atualmente exigidos por legislação, que podem ser atingidos por vias alternativas à fermentação, por exemplo através da adição de aditivos, estão mais alinhados à garantia da qualidade e menos a confirmação da identidade desse produto (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001).

Por motivação econômica, fraudadores aproveitam as vulnerabilidades da cadeia de abastecimento de alimentos para adulterar produtos por meio de diversas estratégias, como substituição de ingredientes e compostos, diluições e/ou uso de produtos não autorizados. Tais adulterações frequentemente envolvem a escolha de substâncias não monitoradas rotineiramente com uso de tecnologias para evitar sua detecção (SPINK et al., 2017).

Nesse cenário, a autenticidade dos alimentos tornou-se uma preocupação de toda a cadeia e do mercado de alimentos, não apenas do ponto de vista econômico como também legislativo e de qualidade. Tal questão tem engajado pesquisadores por todo o mundo a estudar e desenvolver técnicas analíticas rápidas e precisas para detecção de fraude em alimentos, possibilitando além da confirmação da fraude, dados históricos e o conhecimento dos mecanismos envolvidos, informações essenciais para reduzir a vulnerabilidade à fraude (HONG et al., 2017).

A aplicação de adulterantes não usuais e que dificilmente serão detectados usando análises direcionadas convencionais, resultou no desenvolvimento de sistemas de testes não direcionados que detalham a análise química de toda a matriz alimentar, por meio da construção de uma impressão digital dos alimentos. As técnicas não direcionadas existentes incluem métodos baseados nas análises espectroscópicas, como a ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria e cromatografia (MCGRATH et al., 2018).

Devido à complexidade dos espectros gerados nas análises de impressão digital dos alimentos, os resultados são avaliados com o auxílio de

modelos quimiométricos utilizados para reconhecimento de padrões e relacionamentos dentro de dados altamente complexos, traduzindo-os em parâmetros analíticos úteis e que permitem identificar alimentos com base em sua origem geográfica, variedade de espécies e a contaminação e/ou adulteração de amostras (MCGRATH et al., 2018).

Com o objetivo de limitar a ação de fraudadores, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) alterou as Instruções Normativas (IN) n° 6 de 3 de abril de 2012 e n° 34 de 29 de novembro de 2012 que estabelecem diretrizes do Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) de bebidas fermentadas no Brasil, através da publicação da Instrução Normativa n° 16, de 19 de março de 2020 que estabelece a proibição do uso de açúcar na elaboração do fermentado de fruta que sirva de matéria-prima para a produção de fermentado acético de fruta (BRASIL, 2020).

Diante desse contexto, com esse projeto propôs-se estudar a aplicação de análises não direcionadas de rápida e simplificada execução no desenvolvimento da impressão digital de vinagres de maçã comercializados no Brasil com o objetivo de detectar fraudes por adição de vinagre de álcool ou outra fonte de álcool de menor custo, proveniente da cana-de-açúcar. E adicionalmente, obter informações atuais em relação ao conhecimento do consumidor sobre a qualidade e fraude de vinagres através de um questionário on-line.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Dispor de diferentes análises instrumentais na detecção de fraude em vinagres de maçã comercializados no Brasil, além de gerar dados atualizados sobre o consumo de vinagre e o conhecimento dos consumidores em relação a qualidade desse produto, por meio de pesquisa de campo.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar amostras comerciais de vinagre de maçã e amostras referência, através de análises de acidez, álcool, cinzas, extrato seco reduzido e sulfatos;
- Analisar e comparar o perfil das amostras caracterizadas com amostras conhecidas de vinagre de maçã e vinagre de álcool por Espectroscopia UV-Vis;
- Determinar e comparar o perfil das amostras caracterizadas com amostras conhecidas de vinagre de maçã e vinagre de álcool por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), identificando os compostos mais relevantes;
- Quantificar os principais compostos evidenciados pelas análises qualitativas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE);
- Caracterizar fraude nos vinagres analisados pela interpretação dos dados obtidos, aplicação de Análise dos Componentes Principais (ACP) e o embasamento teórico dos procedimentos de adulteração utilizados no vinagre de maçã;
- Realizar uma pesquisa de campo, com questionário on-line, para avaliar o conhecimento do consumidor em relação à qualidade e fraude de vinagres no Brasil.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 VINAGRE

#### 3.1.1 História do Vinagre

Ao líquido obtido a partir da fermentação de produtos que contenham amido e/ou açúcar, com acidez volátil mínima de 4% e consumido pelas mais

diversas populações há milhares de anos, denomina-se fermentado acético, popularmente conhecido como vinagre (LIM et al., 2019).

Etimologicamente, a palavra vinagre advém de “*vin*” e “*aigre*” do Francês vinho azedo, que por sua vez tem origem do Latim “*vinun acre*” (vinho azedo) ou “*vinun acetum*” (vinagre de vinho). A palavra *acetum* é derivada do verbo *acere* que significava tornar-se pungente, azedar, denominação mais que apropriada para vinagre (MAZZA; MUROOKA, 2009).

Nesse sentido, a origem do vinagre, vinculada à origem do vinho, ocorre juntamente com o início da agricultura e a descoberta da possibilidade da fermentação, a princípio alcoólica, de frutas, vegetais e cereais, no período neolítico entre 8.500 a 4.000 AEC (MAZZA; MUROOKA, 2009).

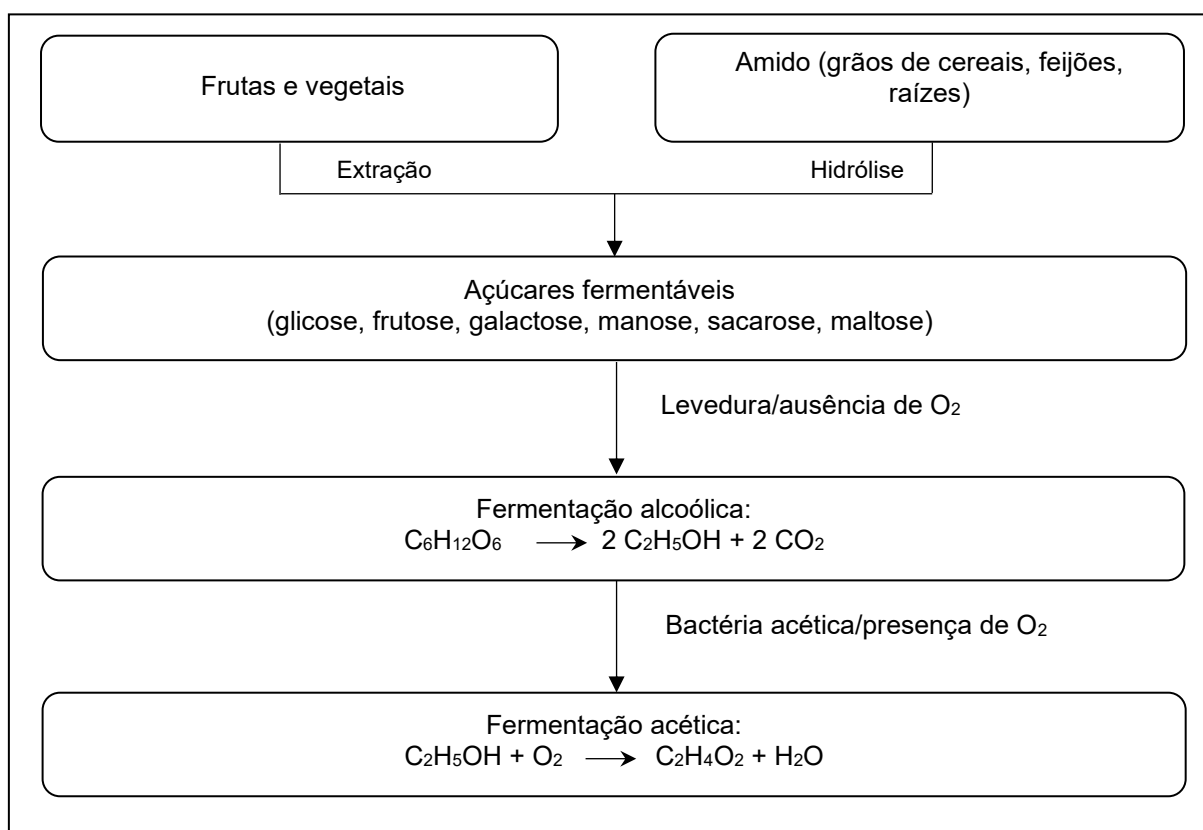
Inicialmente considerado um subproduto alimentar obtido pela deterioração do vinho quando exposto ao ar, o vinagre tornou-se um produto versátil ao longo dos séculos. Os Babilônios o utilizavam intencionalmente na produção de picles e na conservação de alimentos, enquanto na Grécia era recomendado para a limpeza de úlceras e tratamento de feridas. Na idade média, foi sugerido para lavagem de mãos, rosto e boca como forma de proteção contra infecções (LIM et al., 2019).

Atualmente, após inúmeros estudos científicos e a confirmação da presença não apenas do ácido acético, mas também de diversos compostos bioativos, o vinagre é classificado como uma bebida saudável, de consumo puro, ou diluído, utilizado como condimento, ou agente aromatizante, acidulante e conservante natural de alimentos (LIM et al., 2019).

### 3.1.2 Processo Produtivo do Vinagre

O vinagre é obtido por um processo de fermentação em dois estágios: a fermentação alcoólica e a fermentação acética. No primeiro estágio, as leveduras convertem os açúcares disponíveis na matéria-prima utilizada em álcool e dióxido de carbono. No segundo estágio, o álcool é convertido por bactérias aeróbicas em ácido acético e água (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). O fluxograma de fermentação do vinagre é apresentado na Figura 1.

**Figura 1:** Esboço do fluxograma de fermentação do vinagre



**Fonte:** HO et al., 2019.

A acetificação na produção de vinagre é realizada por bactérias do ácido acético (BAA), ou comumente denominadas bactérias acéticas, essas são aeróbias, gram-negativas ou podem ser tornar gram-variáveis, de acordo com o envelhecimento da célula, não formadoras de esporos, com habilidade de oxidar incompletamente álcoois e açúcares em ácidos orgânicos. Seu crescimento é ótimo na faixa de pH de 5,0-6,5, podendo crescer em pH 3,0-4,0, e temperatura de 28-30 °C. A oxidação do etanol a ácido acético no vinagre é realizada principalmente por bactérias do gênero *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter* dentre os 19 gêneros classificados do grupo (BAA), sendo esse processo afetado pela concentração de oxigênio, temperatura e pH (HO et al., 2019; QIU; ZHANG; HONG, 2021).

Em meios líquidos, *Acetobacter* forma um filme ou película de celulose, onde as bactérias acéticas e as leveduras presentes no caldo de fermentação ficam emaranhadas para formar uma estrutura semelhante a uma esteira ou

tapete chamada “mãe-do-vinagre”. A oxidação do vinagre se inicia quando a “mãe-do-vinagre”, obtida na produção do vinagre anterior, é adicionada à fermentação nova, sendo essa uma cultura microbiologicamente indefinida, dessa forma, sua alteração pode levar a variações na qualidade do vinagre. Por esse motivo e pelo elevado tempo de espera de fermentação inerente a esse tipo de cultura, estuda-se o isolamento e a produção de culturas *starter* viáveis (MATHEW et al., 2019).

A evolução do método artesanal de fabricação do vinagre ocorreu com o desenvolvimento do método francês *Orleans*, onde o suco de fruta fermentado é colocado em tonéis com preenchimento de cerca de 50% a 70%. O percentual vazio do recipiente garante a concentração de oxigênio necessária para a conversão do álcool em ácido acético pelas bactérias acéticas. Ao final da fermentação, 60% a 70% do vinagre é substituído por matéria-prima para continuidade da fermentação. Esse processo é lento e por tal motivo, concede características sensoriais mais acentuadas ao produto final quando comparado aos métodos de fermentação rápida (DABIJA; HATNEAN, 2014).

Com o objetivo de acelerar o processo de fermentação do vinagre, os métodos existentes foram aprimorados na Alemanha gerando dois novos métodos: (1) Processo gerador: consiste de duas câmaras, uma superior e maior onde material sólido, normalmente lascas de madeira, é depositado como mecanismo para aderência das bactérias acéticas e uma inferior e menor, onde o vinagre será coletado após ser filtrado. Nesse processo, ar é injetado e soprado pelo sistema de baixo para cima, a fermentação leva aproximadamente 3 a 7 dias, e ao final da fermentação 2/3 do produto é retirado e substituído por nova matéria-prima, renovando o processo fermentativo. (2) Processo submerso: as bactérias acéticas trabalham em suspensão devido à intensa aeração promovida nos grandes tanques de aço inox com capacidade de 10.000 a 40.000 litros onde a fermentação ocorre. Esse processo permite maior controle dos parâmetros de fermentação e contém além do sistema de injeção de ar, o sistema de resfriamento, o sistema de controle de formação de espuma e as válvulas de carga e descarga de matéria-prima e produto final, respectivamente (HO et al., 2017).

Os métodos citados acima são os mais utilizados atualmente, o processo gerador é considerado um método estático com abundante crescimento das

bactérias acéticas na interface líquido-gás do sistema, e as concentrações de ácido acético produzidas não são tão altas. Por sua vez, o processo submerso permite a presença das bactérias livremente submersas no líquido em fermentação, graças ao fornecimento constante de ar. Esse processo atinge os maiores rendimentos em termos de ácido acético e, por isso, é mais empregado na fabricação de larga escala (LUZÓN-QUINTANA; CASTRO; DURÁN-GUERRERRO, 2021).

### 3.1.3 Composição do Vinagre

A composição do vinagre é diretamente dependente da matéria-prima utilizada, porém de forma geral seu forte aroma pungente e sabor azedo se devem à presença do ácido acético. Além do ácido acético, outros subprodutos da fermentação estão presentes no vinagre, tais como, ácidos orgânicos voláteis, ésteres, cetonas e aldeídos. Estudos relatam mais de 60 compostos voláteis em amostras de vinagre tradicional turco e mais de 200 tipos de compostos químicos no vinagre de bambu, por exemplo (HO et al., 2017; LIM et al., 2019).

Xia e colaboradores (2020) apresentaram uma revisão dos nutrientes e compostos bioativos de diversos tipos de vinagre e destacaram a presença dos aminoácidos, açúcares, vitaminas e minerais como os principais nutrientes, e os ácidos orgânicos, polifenóis, melanoidinas e tetrametilpirazina como os principais compostos bioativos.

No Brasil, a classificação do vinagre é dada por sua composição ou forma de obtenção (BRASIL, 2012a). A classificação brasileira do vinagre está apresentada na Figura 2.

**Figura 2:** Classificação e denominação do vinagre

Composição ou forma de obtenção	Classificação	Denominação
Fermentação acética do fermentado alcoólico de mistura hidroalcoólica	de álcool	Vinagre de álcool

originária do álcool etílico potável de origem agrícola		
Fermentação acética do fermentado alcoólico de uma ou mais frutas	de fruta	Vinagre de fruta
Fermentação acética do fermentado alcoólico de um ou mais cereais	de cereal	Vinagre de cereal
Fermentação acética do fermentado alcoólico de um ou mais vegetais	de vegetal	Vinagre de vegetal
Fermentação acética do fermentado alcoólico de duas ou mais das seguintes matérias-primas: fruta, cereal e vegetal	Misto	Vinagre misto de vegetais
Fermentação acética do fermentado alcoólico de mel de abelha	de mel	Vinagre de mel
Fermentado acético adicionado de suco de fruta ou suco de vegetal ou de mel de abelha, em conjunto ou separadamente	Composto	Vinagre de (nome genérico do vinagre) composto
Fermentado acético adicionado de condimento	Condimentado	Vinagre de (nome genérico do vinagre) condimentado
Fermentado acético de fermentado alcoólico com acidez volátil	Duplo	Vinagre duplo

superior a oito gramas de ácido acético por cem mililitros do produto		
Fermentado acético de fermentado alcoólico com acidez volátil superior a doze gramas de ácido acético por cem mililitros do produto	Triplo	Vinagre triplo

Fonte: BRASIL, 2012a.

Adicionalmente, os parâmetros brasileiros requeridos para o fermentado acético são divididos conforme sua classificação. Um comparativo entre os vinagres de álcool, fruta, cereal e vegetal é apresentado na Figura 3.

**Figura 3:** Parâmetros do fermentado acético no Brasil

Parâmetros	Álcool		Fruta		Cereal		Vegetal/Mel	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Acidez volátil (g/100mL)	4,00	-	4,00	-	4,00	-	4,00	-
Álcool (%v/v) a 20 °C	-	1,0	-	1,0	-	1,0	-	1,0
Cinzas (g/L)	-		1,00	5,00	1,00	5,00	1,00	5,00
Extrato seco reduzido (g/L)	-		6,00	-	7,00	-	7,00	-
Sulfatos (g/L s.de potássio)	-		-	1,00	-	1,00	-	1,00
Aspecto	Ausência de elementos estranhos à sua natureza e composição.							
Cheiro	Característico.							
Sabor	Ácido.							
Cor	De acordo com a matéria-prima de origem e composição.							

Fonte: BRASIL, 2012a.

Transformações físico-químicas significativas ocorrem na matéria-prima ao longo do processo de fermentação para a obtenção do vinagre. Compostos como pigmentos tem sua concentração reduzida, ao passo que compostos bioativos como ácidos orgânicos, polifenóis, melanoidinas e tetrametilpirazina são produzidos em diversos tipos de vinagre (HORNEDO-ORTEGA et al., 2017; XIA et al., 2020).

Tais compostos são constituídos no processo de fermentação e envelhecimento do vinagre, sendo diretamente influenciados pela matéria-prima utilizada, pelo método de fermentação e pela duração da acetificação (LIM et al., 2019). Como exemplo, Liu e colaboradores (2019) detectaram dentre os 23 vinagres de frutas analisados, maior conteúdo de ácidos orgânicos no vinagre de vinho branco e no vinagre de maçã, e em relação aos compostos fenólicos, as maiores concentrações de ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido p-cumárico foram encontradas no vinagre balsâmico de Modena.

Dentre os ácidos orgânicos, o ácido acético apresenta o mais alto teor (30 a 50%) sendo o principal ácido orgânico volátil do vinagre e em seguida vem o ácido láctico, principal ácido orgânico não volátil detectado (XIA et al., 2020).

A comprovada presença de compostos bioativos com atividades funcionais tornou o vinagre alvo de estudos que buscam confirmar suas capacidades antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante, anticâncer, de controle da glicemia, de regulação do metabolismo lipídico, perda de peso, entre outros (CHEN et al., 2016; HALIMA et al., 2017).

#### 3.1.4 Vinagre de Maçã

Fruta rica em compostos fenólicos, pectina e açúcar, a maçã tem reconhecida capacidade antioxidante devido à presença de ácido clorogênico, procianidina, epicatequina, clorexidina, catequina, hiperósido e quercetina em sua composição (KALINOWSKA et al., 2014; LONCARIC et al., 2020; MIHAILOVIC et al., 2018).

Os compostos bioativos do vinagre de maçã, que provêm de sua matéria-prima e são alterados e/ou formados pelo processo de produção, são

predominantemente os ácidos orgânicos (acético, málico, láctico, succínico e cítrico), e os compostos fenólicos (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido protocatecuico e ácido gálico) (BAKIR et al., 2017; DU et al., 2019; LIU et al., 2019; REN et al., 2017).

Devido ao uso de diferentes variedades de maçã, a escolha da tecnologia produtiva e a regionalidade empregada em sua fabricação, torna-se difícil compilar uma quantidade suficientemente abrangentes de dados para que seja possível estabelecer uma única composição para o vinagre de maçã (JOSHI; SHARMA, 2009). Levando esse fato em consideração, os principais constituintes do vinagre de maçã são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Composição do vinagre de maçã

Composição	Valor (% P/V)
Sólidos não açucarados	1,20-2,90
Açúcar total	0,15-0,70
Álcool	0,03-2,00
Proteína	0,03
Glicerol	0,23-0,46
Sorbitol	0,11-0,64

**Fonte:** JOSHI; SHARMA, 2009.

A fabricação do vinagre de maçã pode ser realizada por métodos de fermentação tradicionais como o processo *Orleans* ou por métodos rápidos como o submerso, de maior utilização atualmente. Além disso, seu amadurecimento ocorre durante o armazenamento em tanques de madeira ou aço inox, ocorrendo nessa etapa alterações sensoriais importantes como a formação de acetato de etila que proporciona sabor frutado e alteração de cor (JOSHI; SHARMA, 2009).

Diferenças nas maçãs empregadas podem ter um efeito importante na análise composicional do vinagre, particularmente para compostos não voláteis, assim como a escolha do processo fermentativo afeta seu sabor. Por exemplo, a acetificação lenta com o método *Orleans* produz um vinagre com características sensoriais diferenciadas devido às quantidades mais abundantes de ésteres do que o produzido pelo processo submerso (JOSHI; SHARMA, 2009).

Em relação a seus benefícios, estudos preliminares indicam múltiplos efeitos antimicrobianos do vinagre de maçã contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Adicionalmente, sua suplementação dietética pode atuar em processos inflamatórios pela redução da liberação de citocinas induzidas durante a infecção por leucócitos mononucleares e pelo aumento da capacidade fagocítica dos monócitos (YAGNIK; SERAFIN; SHAH, 2018).

*In vitro*, o ácido acético presente no vinagre de maçã imita a atividade da droga padrão metformina, utilizada no tratamento de diabetes mellitus tipo 2, reduzindo a absorção de glicose no intestino delgado. O acompanhamento molecular indicou que o ácido acético inibiu as enzimas dissacaridases por ligação ao seu sítio ativo e conseqüentemente reduziu a velocidade de degradação de dissacarídeos em monossacarídeos (SAQIB, 2018).

Efeitos benéficos no controle do peso corporal e do perfil metabólico sérico em indivíduos com sobrepeso ou obesidade foram atingidos através da junção do consumo de vinagre de maçã a uma dieta calórica restritiva, com a obtenção significativa na redução do peso corporal, índice de massa corporal (IMC), circunferência do quadril, índice de adiposidade visceral e escore de apetite. Além da redução significativa dos níveis de triglicérido plasmático (TG) e colesterol total (CT) e do aumento da concentração de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) (KHEZRI et al., 2018).

Por fim, não somente seu consumo, mas também seu uso externo pode ser benéfico. A aplicação externa de vinagre de maçã como complemento ao tratamento conservador de rotina foi utilizada para potencializar a melhora nos sintomas e nos níveis de dor e ansiedade de pacientes com varicosidade (ATIK; ATIK; KARATEPE et al., 2016).

### 3.1.5 Valor de Mercado

A disponibilidade do vinagre é mundial e por sua versatilidade tem ganho cada vez mais valor de mercado. De acordo com o relatório *Global Dressing Vinegar Market Analysis and Forecast* até o final de 2024 o mercado mundial espera atingir a marca de 54.772 toneladas métricas (MT) de vinagre balsâmico, 31.720 MT de vinagre de vinho tinto, 14.297 MT de vinagre de vinho branco,

13.427 MT de vinagre de maçã, 8.541 MT de vinagre de malte e 7.539 MT de vinagre de arroz (PERSISTENCE MARKET RESEARCH, 2017).

Há uma enorme variedade de vinagres em termos de perfil sensorial, preços e tipos. Os vinagres provenientes de matéria-prima destilada ou os vinagres sintéticos são os mais baratos, o vinagre de maçã é mais comumente encontrado e popularmente difundido, e o balsâmico é considerado um produto *premium* (LIM et al., 2019).

Uma forma de aumentar o valor agregado do vinagre é fazendo uso da Indicação Geográfica (IG), rótulo concedido aos produtos de uma origem geográfica específica e, portanto, com qualidades e/ou reputação correlacionadas a essa origem. A União Europeia delineou três tipos de IG, a Denominação de Origem Protegida (DOP), a Indicação Geográfica Protegida (IGP) e as Tradições Especiais Protegidas (TSP). O produto DOP deve ser tradicional e totalmente fabricado dentro da região específica, a IGP deve ser tradicional e pelo menos parcialmente fabricado dentro da região específica, já a TSP não vincula o produto a uma região, mas sim a um caráter específico e com fabricação tradicional (UNIÃO EUROPEIA, 2012).

Como exemplos de vinagres com Indicação Geográfica tem-se o Vinagre Balsâmico Tradicional de Modena na Itália (DOP), Vinagre de *Jerez* na Espanha (DOP) e o vinagre aromático de *Zhenjiang* na China (IGP) (LIM et al., 2019).

### 3.2. FRAUDE EM ALIMENTOS (*FOOD FRAUD*)

O ato de adulterar intencionalmente um alimento para obtenção de ganho financeiro é denominado de fraude em alimentos ou do inglês *Food Fraud*. Tal adulteração pode incluir substituição deliberada de algum ingrediente, diluição, falsificação ou deturpação de alimentos, ingredientes e embalagens, assim como declarações falsas ou enganosas sobre o produto (FAO, 2017). De maneira geral, os alimentos mais comumente associados à fraude incluem óleos, peixe, mel, leite e derivados, produtos à base de grãos e de carnes, sucos de frutas, vinhos, bebidas alcoólicas, especiarias, café e chá (HONG et al., 2017).

Por se tratar de um ato intencional com finalidade econômica, seu gerenciamento tem um enfoque diferente daquele utilizado para gestão de segurança de alimentos (*Food Safety*) e defesa de alimentos (*Food Defense*).

Ciências sociais, criminologia e decisões de negócios também devem ser abordados nos estudos, e a visão de risco dos programas de segurança, deve ser acrescida da visão de vulnerabilidade; considerando a vulnerabilidade como uma fraqueza ou falha que cria oportunidades para eventos indesejáveis, a vulnerabilidade à fraude em alimentos é considerada a susceptibilidade de um sistema a essa fraude (SPINK et al., 2017).

Nesse sentido, três elementos principais estão conectados a essa vulnerabilidade: oportunidade, motivação e as medidas de controle. As oportunidades apontam os caminhos dos infratores, as motivações indicam por que, e as medidas de controle podem neutralizar a vulnerabilidade resultante das oportunidades e motivações (VAN RUTH et al., 2017). A incorporação de controles para a mitigação de fraude alimentar no sistema de gestão de segurança de alimentos é proposta pela *Global Food Safety Initiative* (GFSI) e inclui, como ponto de partida, a avaliação de vulnerabilidade de fraude alimentar e o seu plano de mitigação (GFSI, 2018).

Existem alguns indicadores que podem ser utilizados para identificar o risco de fraudes no setor de alimentos, como os preços das commodities, as quebras de safra que aumentam o custo das matérias-primas e, por consequência, os preços de sua cadeia de suprimentos e o rápido aumento da oferta de alimentos. Exemplo concreto, o mel de *manuka* da Nova Zelândia, tinha uma produção anual de 1.700 toneladas em 2014, segundo o Ministério das Indústrias Primárias da Nova Zelândia, porém, cerca de 10.000 toneladas do produto foram vendidas no mundo no mesmo período (ELLIOTT, 2014).

A fraude pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia de abastecimento de alimentos, porém, geralmente não causa problemas à saúde do consumidor. Esse cenário dificulta a identificação da fraude pela população em geral, que apesar de não adoecer, é lesada financeiramente pela aquisição de um produto de qualidade inferior ao anunciado. Os consumidores esperam comprar um alimento genuíno, íntegro, autêntico e de qualidade, e os casos de fraude abalam a confiança consumidor x fornecedor (FORC, 2019).

Já não é incomum a suspensão da venda de produtos fraudados no Brasil. Em 2019, várias marcas de azeite de oliva tiveram a venda de lotes proibida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por fraude, em sua maioria vinculadas à mistura com óleo de soja e óleos de origem

desconhecida. As fraudes foram comprovadas através de análise em equipamento de infravermelho, instalado em um laboratório móvel que percorreu o país recolhendo e testando amostras (LIMA, 2019).

A operação Leite Compensado trouxe a público um esquema de fraude histórico do leite na região Sul do Brasil, onde transportadores do produto estavam adicionando água e produtos químicos ao leite na intenção de aumentar o volume, e conseqüentemente, o valor recebido pelo serviço prestado. Tal acontecimento desencadeou uma série de ações no estabelecimento de meios capazes de viabilizar a expansão da produção sem o declínio da qualidade do produto (MAINARDI, 2013).

Outro escândalo que abalou o mercado nacional e internacional, foi a operação Carne Fraca deflagrada pela Polícia Federal em 2017, que apontou mais de 30 empresas acusadas de adulterar carne maquiando o aspecto de produtos estragados, alterando datas de vencimento e utilizando de agentes químicos não autorizados (LINEAR COMUNICAÇÃO, 2017).

A capacidade dos consumidores ou compradores de avaliar a presença de determinados atributos somente após consumir ou usar o produto (atributos de experiência), ou a incapacidade de determinar a presença de um atributo mesmo após o consumo (atributos de credibilidade) fornece aos vendedores um incentivo para cometer fraudes. Essa incapacidade do consumidor de detectar diferenças de qualidade também pode afetar os próprios produtores, visto que em cenários em que os produtores de alta qualidade são incapazes de diferenciar seu produto com segurança, ou em ambientes onde ocorrem altos níveis de rotulagem incorreta, falsificação ou desvio, os produtores de alta qualidade, e conseqüente elevado custo, podem ser expulsos do mercado e os produtores de baixa qualidade podem obter vantagem econômica (EHMKE et al., 2019).

Geralmente, a fraude alimentar é indetectável, exceto por análises científicas, sendo, portanto, de extrema importância o papel da ciência forense de alimentos sobre sua investigação e sua aplicação. Um serviço de laboratório resiliente, que utiliza abordagens padronizadas e estabelecidas, é uma parte essencial da colaboração necessária na prevenção da ocorrência de crimes alimentares (ELLIOTT, 2014).

Na análise de fraude alimentar, existem dois problemas principais: (1) A autenticação da origem de um produto em termos de sua proveniência geográfica, botânica/animal, ou processo de fabricação; (2) A comprovação da ausência de adulteração ou adição de uma substância não declarada. Para resolução do problema de autenticação, a resposta necessária é qualitativa, no entanto, um único sinal geralmente não é suficiente, sendo necessária uma abordagem multivariada. Por sua vez, a adulteração de alimentos pode ser resolvida de duas maneiras: caso a adulteração seja conhecida, geralmente é realizada uma análise quantitativa, porém, caso não seja, uma análise qualitativa pode apresentar resultados satisfatórios (CALLAO; RUISÁNCHEZ, 2018).

### 3.2.1 Fraude em Vinagres

As diferentes matérias-primas e tempos de maturação levam à produção de produtos característicos, o que permite a cada variedade de vinagre possuir seus próprios compostos distintos em uma faixa de concentração própria. Portanto, a identificação e a análise quantitativa desses compostos podem ser usadas para validar a autenticidade de um vinagre específico (LIM et al., 2019).

Os vinagres de sidra (vinho de maçã) podem ser distinguidos das soluções de ácido acético sintético pelo seu conteúdo relativamente mais alto de sorbitol e pela presença de compostos fenólicos únicos, como a cloridzina, que são detectáveis cromatograficamente. A ausência de ácido málico não é considerada prova de que o vinagre não é derivado da sidra, uma vez que as bactérias lácticas convertem o ácido málico em ácido láctico, que por sua vez pode ser oxidado por bactérias acéticas (JOSHI; SHARMA, 2009).

Devido às variações sensoriais, nutricionais e econômicas dos vinagres, sua autenticação é essencial para garantir a proteção dos consumidores e fabricantes honestos. Em geral, qualquer líquido com quantidade suficiente de ácido acético pode ser denominado vinagre, incluindo vinagres sintéticos, produzidos pela diluição de certa porcentagem do ácido acético glacial. Entretanto, dependendo das leis e regulamentos regionais, misturas não declaradas na rotulagem também podem ser consideradas fraudes (LIM et al., 2019).

O padrão de identidade e qualidade (PIQ) para bebida fermentada de fruta no Brasil, estabelece que a fermentação deve ser efetuada de forma que a bebida fermentada apresente as características odoríferas, sápidas, ou a combinação destas próprias dos elementos naturais voláteis contidos no mosto fermentado ou derivados do processo fermentativo e que a bebida fermentada seja obtida da fermentação do suco de uma única fruta (BRASIL, 2012b).

Um dos problemas correntes de adulteração relacionado ao vinagre no Brasil é a mistura de vinagre de álcool de cana-de-açúcar, de menor preço, ao vinagre de vinho, sendo comercializado como vinagre de vinho. A fraude garante ganhos econômicos não apenas pelo preço diferenciado dos vinagres, mas também por conta de seus rendimentos, 1 litro de vinho gera entre 2 e 2,5 litros de vinagre de vinho, enquanto que 1 litro de álcool produz entre 18 e 20 litros de vinagre de álcool, com 4% de ácido acético. Contudo, é importante ressaltar que a qualidade do produto adulterado é irreversivelmente prejudicada (RIZZON, 2006). Entretanto, não são encontradas publicações recentes do país relacionadas a esse tipo de fraude.

Recentemente, com o intuito de coibir fraude ao consumidor pela utilização de vinagre de álcool em detrimento da utilização de vinagre de frutas, o Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento (MAPA) alterou as Instruções Normativas nº 6 de 3 de abril de 2012 e nº 34 de 29 de novembro de 2012 que estabelecem diretrizes do PIQ de bebidas fermentadas, , através da publicação da Instrução Normativa nº 16, de 19 de março de 2020 que estabelece a proibição do uso de açúcar na elaboração do fermentado de fruta que sirva de matéria-prima para a produção de fermentado acético de fruta. Dessa forma, a Instrução Normativa nº 6 passou a vigorar com a alteração do artigo 6º onde em parágrafo único se estabelece a proibição da produção de fermentado acético de fruta mediante a utilização do fermentado de fruta obtido por chaptalização do mosto, mesmo quando observados os limites previstos na Instrução Normativa nº 34, que, por sua vez, teve seu artigo 7º redefinido para a proibição da utilização de açúcar, sacarose, açúcar invertido, glicose, frutose, maltose ou seus xaropes para a produção de fermentado de fruta que sirva de matéria-prima para produção de fermentado acético de fruta (BRASIL, 2020). O que reacende a importância dessa discussão e de estudos voltados para o desenvolvimento de métodos de verificação dessas regras.

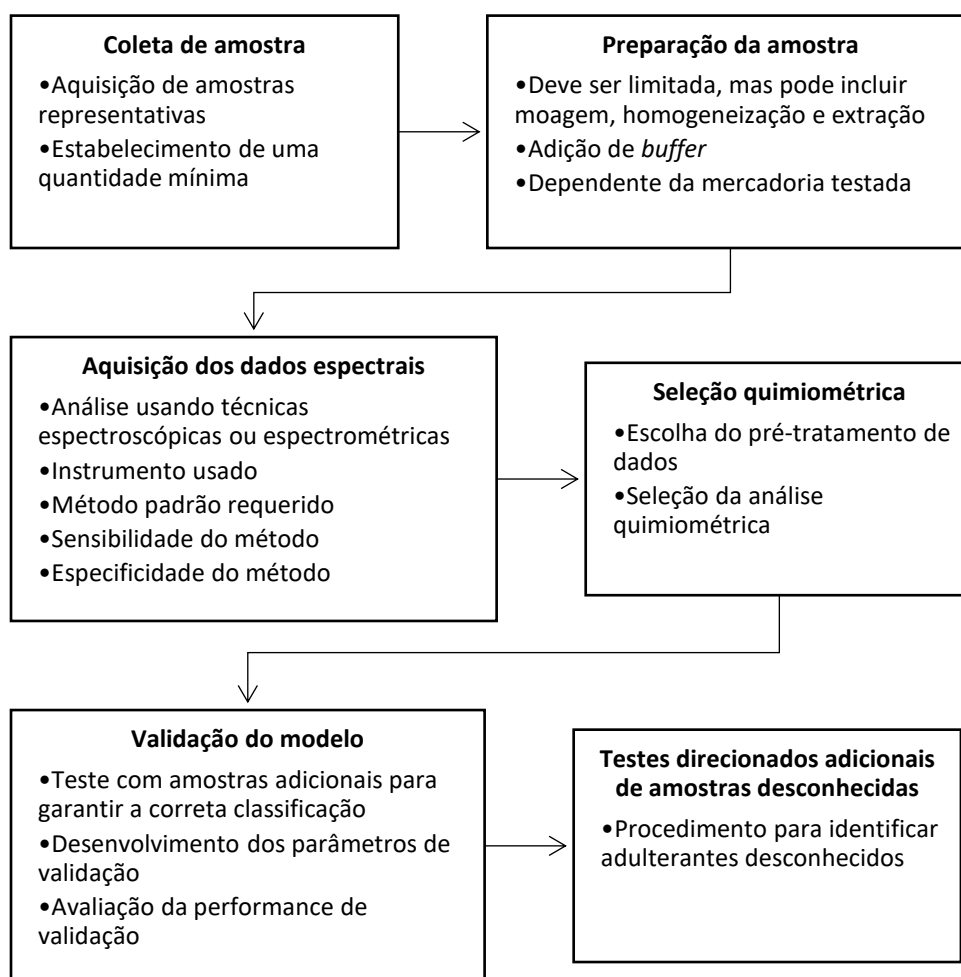
### 3.2.2 Métodos para Detecção de Fraudes em Alimentos

Várias técnicas têm sido utilizadas para detectar adulteração e fraude em alimentos, estando estas vinculadas à categoria do alimento analisada. Métodos baseados em espectrometria de massas (EM) são amplamente utilizados na maioria das categorias de alimentos, sendo o método mais frequentemente usado na análise de especiarias, extratos, cereais, grãos e leguminosas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG) também são aplicadas na análise de especiarias, óleos e alimentos orgânicos. Além dessas, a ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido utilizada com frequência para discriminar a autenticidade de óleos, cereais, grãos, bebidas alcoólicas e sucos de frutas (HONG et al., 2017).

A utilização de análises de maior complexidade é essencial quando o objetivo é detectar a adulteração de vinagres de vinho, fruta e mel com a mistura de vinagres de açúcar ou de destilados, visto que os parâmetros exigidos por legislação (acidez, teor de etanol, cinzas, extrato seco) podem ser corrigidos com a adição de aditivos como reguladores de acidez (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001).

Verifica-se que uma série de técnicas não direcionadas têm sido utilizadas com o objetivo de desenhar a impressão digital do alimento de forma rápida, não destrutiva, com alto rendimento e quantidade limitada de treinamentos (MCGRATH et al., 2018). Os estágios de uma análise não direcionada são apresentados na Figura 4.

**Figura 4:** Visão esquemática dos estágios da análise não direcionada.



**Fonte:** MCGRATH et al., 2018

A tendência pela aplicação de análises não direcionadas por plataformas analíticas espectroscópicas tem se mostrado tão relevante na busca pela impressão digital dos alimentos, que Ríos-Reina e colaboradores (2021) propuseram a discussão de mudança da terminologia impressão digital por impressão espectral, do inglês “*spectralprint*”. A espectroscopia UV-Vis, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de fluorescência, ressonância magnética nuclear e a espectroscopia Raman foram apresentadas como as principais técnicas aplicadas em vinhos e vinagres.

### 3.2.2.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Inicialmente desenvolvida para elucidação de moléculas simples, a RMN tem atualmente uma aplicação dominante na investigação de misturas complexas, pois fornece uma ampla gama de compostos químicos simultaneamente, sendo capaz de auxiliar a ciência de alimentos na identificação de fraudes sofisticadas, caracterização da origem geográfica e potenciais marcadores para fins de autenticação (CONSONNI; CAGLIANI, 2019).

Dentre as vantagens dessa técnica, quando aplicadas na análise de vinhos e vinagres, se destacam sua rapidez, a necessidade de pouca quantidade de amostra, assim como seu preparo rápido e simples, determinação simultânea de vários metabólitos, alta repetibilidade e reprodutibilidade. Entretanto, é necessário experiência para realização dos ensaios e para a interpretação dos dados que requerem o uso de técnicas quimiométricas (RÍOS-REINA et al., 2021).

Basicamente, o uso da RMN para análise de fraude em alimentos pode ser realizado usando as abordagens de análise direcionada ou não direcionada. A abordagem direcionada permite a identificação de marcadores específicos de identidade/adulteração para um determinado alimento. Porém, nem sempre a adulteração pode se restringir à identificação de um ou alguns compostos marcadores, em alguns casos, a análise baseia-se na combinação de vários compostos ou em todo o perfil metabólico do alimento. Nesse contexto, a abordagem não direcionada é utilizada, pois permite a caracterização da composição química de misturas complexas, fornecendo simultaneamente informações sobre uma ampla gama de metabólitos ou um conjunto de metabólitos selecionados (SOBOLEV et al., 2019).

Nesse sentido, aplicações específicas e abordagens diferentes são utilizadas no processo de autenticação de diversos alimentos, como pasta de tomate, açafrão, mel, café torrado, entre outros. A análise de méis, permite verificar a origem botânica e adulteração com açúcares, na cerveja é possível distinguir entre os principais tipos e detectar sua origem geográfica, já em especiarias é possível identificar adulterações brutas ou quantificar ingredientes marcadores, como óleos essenciais (CONSONNI; CAGLIANI, 2019; KUBALLA et al., 2018).

Com relação aos vinagres, o vinagre balsâmico de Modena (BVM) e o tradicional vinagre balsâmico de Modena (TBVM) podem ser diferenciados por sua matéria-prima, processo de fermentação e principalmente período de envelhecimento, sendo que o TBVM é envelhecido por no mínimo 12 anos e o BVM por no mínimo 3 anos. Essa significativa diferença no tempo de envelhecimento proporciona modificações expressivas de composição, e por consequência, alterações sensoriais e econômicas. A análise de espectroscopia de RMN combinada à estatística multivariada pode ser utilizada para caracterização e detecção de possíveis fraudes nesse produto. Consonni e colaboradores (2008) sugeriram a evidência de fraude pela análise das diferentes proporções das isoformas de frutose e glicose em amostras de BVM e TBVM, onde, por exemplo, a presença da frutose na isoforma  $\alpha$ -piranosídica, ausente nas amostras de BVM, foi indicativa para discriminação inicial das amostras de TBVM.

O vinagre de *Shanxi*, é reconhecido por sua distinta técnica de processamento na China, sendo classificado de acordo com seu tempo de envelhecimento em: (1) *Shanxi aged vinegar* (SAV), para os vinagres com mais de 1 ano de envelhecimento, e (2) *Shanxi mature vinegar* (SMV) para vinagres com menos de 1 ano de envelhecimento. Em virtude dessa diferença o vinagre SAV é comercializado a um preço maior que o SMV e tal fato incentivou Nie e colaboradores (2019) a estudarem esses produtos de forma comparativa. Com auxílio da técnica de RMN em conjunto com a análise estatística multivariada, foi constatado que o vinagre SAV apresentou concentrações mais altas da maioria dos metabólicos em comparação ao vinagre SMV, sendo os aminoácidos os compostos com maior razão de concentração comparado aos demais componentes.

### 3.2.1.2 Espectroscopia de absorção UV-Vis

A espectroscopia UV-vis é uma técnica baseada em medidas de absorção da radiação eletromagnética, nas regiões ultravioleta (UV) e visível do espectro, compreendidas entre o comprimento de onda de 190 nm a 800 nm. Resumidamente, mede-se a quantidade de luz absorvida pela amostra e relaciona-se a mesma com a concentração do analito. A posição espectral de

uma banda de absorção é indicativa da presença ou ausência de certas características estruturais ou grupos funcionais (RÍOS-REINA et al., 2019).

O espectroscópico pode oferecer uma resposta simples e rápida sem exigir etapas complexas de preparação, ainda sua metodologia não-destrutiva e direta é baseada em técnicas não-direcionadas sem a necessidade do uso de referenciais químicos. Por esses motivos, sua utilização tem se tornado cada vez mais atraente nos estudos de autenticação e determinação de origem geográfica de alimentos (RÍOS-REINA et al., 2019).

A espectroscopia de absorção UV-vis pode registrar os espectros de absorção dos diferentes compostos presentes no vinagre, incluindo os fenólicos, obtendo assim uma impressão digital espectroscópica do vinagre específico, que pode diferir quando a amostra analisada pertence a locais diferentes ou é obtida de diferentes matérias-primas (TORRECILLA et al., 2016a).

De fato, a mistura de diferentes vinagres modifica a composição final do produto. Essa mistura não necessariamente gera danos à saúde do consumidor, porém pode constituir uma fraude potencial. A utilização do UV-vis em conjunto com métodos matemáticos de extração de dados permite a identificação de vinagres de diferentes origens botânicas e sua constituição quando em mistura, caracterizando sua adulteração (TORRECILLA et al., 2016b).

### 3.2.1.3 Cromatografia Líquida de ultra eficiência (CLUE)

A cromatografia líquida é utilizada para separar os componentes de uma mistura, onde esses componentes se distribuem em duas fases, móvel e estacionária, dentro da coluna de cromatografia e são detectados com o auxílio de detectores ópticos, eletroquímicos, luminescente e de espectrometria de massas, por exemplo (FANALI et al., 2013).

Ao longo dos anos de utilização dessa técnica, verificou-se que o diâmetro da partícula do material usado na fase estacionária interfere diretamente na eficiência da coluna, sendo sua relação inversamente proporcional. Nesse sentido, a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) foi desenvolvida como uma alternativa mais eficiente, de maior resolução e menor tempo de análise em comparação à cromatográfica líquida de alta

eficiência (CLAE), pois utiliza partículas de 1-5  $\mu\text{m}$  e alta pressão (FANALI et al., 2013).

A cromatografia líquida tem sido empregada para identificação da origem geográfica de vinhos e óleos vegetais como o azeite de oliva e o óleo de palma (CALLAO; RUISÁNCHEZ, 2018). É largamente utilizada para detecção e quantificação de aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, compostos fenólicos, vitaminas e minerais em vinagres (BAKIR et al., 2017; DU et al., 2019; LIU et al., 2019; REN et al., 2017; XIA et al., 2020).

#### 3.2.1.4 Análise de componentes principais (ACP)

Análise de componentes principais (ACP) (PCA, do inglês “*principal component analysis*”), é o método quimiométrico mais difundido e empregado em química. ACP visa decompor dados multidimensionais em um número menor de componentes principais (CP) (PC, do inglês “*principal component*”), facilitando assim a interpretação dos resultados. Constrói-se um novo espaço amostral, no qual as variáveis originais são combinadas e substituídas por número menor de CP, tipicamente duas ou três. As amostras são então representadas graficamente em um número menor de dimensões, o qual facilita o reconhecimento de padrões (FERREIRA et al., 2002).

As CPs são obtidas por uma combinação linear das variáveis originais, cada componente sucessiva explica o máximo de variância dos dados originais não incluídas nas componentes anteriores. Desta forma, as CPs são ortogonais e independentes entre si. A quantidade de informação dos dados originais descrita por cada CP pode ser calculada, e se uma quantidade significativa desta informação é representada no modelo de ACP, o mesmo pode ser usado na interpretação dos dados (BRERETON, 2007).

A ACP fornece como resultados gráficos de escores (do inglês “*scores*”) e pesos (do inglês “*loadings*”). Os gráficos de escores refletem a distribuição das amostras no espaço das CPs, enquanto os gráficos de pesos indicam o quanto cada variável contribui para formação de uma dada CP. Em outras palavras, os pesos representam a magnitude da correlação entre as variáveis medidas e uma dada CP. Desta forma, é possível examinar as relações entre os gráficos de

escores e pesos, e estimar a influência de cada variável no agrupamento observado para as amostras (BRERETON, 2007).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

O estudo foi realizado com amostras comerciais de vinagre de maçã de 5 marcas distintas, adquiridas de 2 lotes diferentes cada, em mercados na cidade de Londrina-PR e região, totalizando 10 amostras. As amostras foram mantidas fechadas e armazenadas a temperatura ambiente até o momento da análise.

Além das amostras comerciais, foram analisadas 2 amostras de referência de vinagre de maçã, sendo uma referência não fraudada (RN) e uma referência fraudada (RF). Ambas as referências foram disponibilizadas por uma indústria de vinagres, e sua comprovação de pureza se deu pelo resultado da análise da Razão Isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  realizada por essa indústria em laboratório externo, seguindo a metodologia estabelecida na Instrução Normativa nº 4 de 05 de fevereiro de 2001 do MAPA (BRASIL, 2001).

As amostras de vinagre de maçã comerciais e as referências foram identificadas conforme apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Identificação das amostras de vinagre de maçã comerciais e as referências estudadas

<b>Tipo de vinagre</b>	<b>Identificação da amostra</b>
Vinagre de maçã marca A	A
Vinagre de maçã marca B	B
Vinagre de maçã marca C	C
Vinagre de maçã marca D	D
Vinagre de maçã marca E	E
Referência não fraudada	RN
Referência fraudada	RF

**Fonte:** o próprio autor

Para as análises instrumentais (UV-Vis, RMN e CLUE), foram adicionadas 8 amostras de vinagre de álcool de cana-de-açúcar em lote único, sendo 2 comerciais e 6 disponibilizadas pela indústria parceira, e mais 5 amostras de vinagre de maçã oriundos da mesma indústria. Tais amostras foram adicionadas com o objetivo de melhorar a performance estatística das análises instrumentais. Essas amostras foram identificadas conforme apresentado nas Tabela 3 e 4.

**Tabela 3:** Identificação das amostras adicionais de vinagre de álcool

<b>Tipo de vinagre</b>	<b>Identificação da amostra</b>
Vinagre de álcool marca F	F
Vinagre de álcool marca G	G
Vinagre de álcool marca S lote H	H
Vinagre de álcool marca S lote I	I
Vinagre de álcool marca S lote J	J
Vinagre de álcool marca S lote K	K
Vinagre de álcool marca S lote L	L
Vinagre de álcool marca S lote M	M

**Fonte:** o próprio autor

**Tabela 4:** Identificação das amostras adicionais de vinagre de maçã

<b>Tipo de vinagre</b>	<b>Identificação da amostra</b>
Vinagre de maçã marca S lote N	N
Vinagre de maçã marca S lote O	O
Vinagre de maçã marca S lote P	P
Vinagre de maçã marca S lote Q	Q
Vinagre de maçã marca S lote R	R

**Fonte:** o próprio autor

## 4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As amostras comerciais e referências foram analisadas em triplicata quanto a acidez total, fixa e volátil, álcool a 20 °C, cinzas, extrato seco reduzido

e sulfatos para caracterização dos vinagres estudados e verificar o atendimento a legislação vigente.

#### 4.2.1 Acidez Total

A acidez total foi determinada pelo método volumétrico do IAL (2008). Uma alíquota de 10 mL de amostra foi diluída com 100 mL de água e titulada com solução de hidróxido de sódio 1M em presença de solução de fenolftaleína até coloração rósea persistente.

Para obtenção da acidez total expressa em g ácido acético/100 mL foi utilizado o cálculo apresentado na Equação 1.

$$\frac{V_o \times M \times f \times PM}{V \times 10 \times n} = \text{ácido acético, g por 100 mL} \quad [\text{Equação 1}]$$

$V_o$  = volume de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação, em mL

$M$  = molaridade da solução de hidróxido de sódio

$PM$  = peso molecular do ácido acético

$n$  = número de hidrogênios ionizáveis do ácido acético

$V$  = volume da amostra em mL

$f$  = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

#### 4.2.2 Acidez Fixa

A acidez fixa foi determinada pelo método volumétrico do IAL (2008), após evaporação da amostra. Foi pipetado 10 mL de amostra em uma cápsula e evaporada em banho-maria até secura. O conteúdo da cápsula foi transferido com água destilada para um Erlenmeyer de 250 mL e foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M na presença de solução de fenolftaleína até ponto de viragem. O cálculo foi efetuado conforme apresentado na Equação 1 e o resultado foi expresso em g de ácido acético/100 mL.

#### 4.2.3 Acidez Volátil

A acidez volátil foi determinada pela diferença entre a acidez total e a acidez fixa, expressa em g de ácido acético/100 mL conforme cálculo apresentado na Equação 2.

$At - Af =$  acidez volátil, em g ácido acético/100 mL

$At =$  acidez total, em g ácido acético/100 mL [Equação 2]

$Af =$  acidez fixa, em g ácido acético/100 mL

#### 4.2.4 Álcool

O teor de álcool real foi determinado pelo método apresentado pelo MAPA (BRASIL, 2016). Uma alíquota de 200 mL de amostra foi medida em um balão volumétrico, lavado com água destilada, neutralizado com hidróxido de sódio 5M e transferida para um conjunto de destilação Marconi®.

Após a destilação foi recolhido em torno de  $\frac{3}{4}$  do volume tomado da amostra e o volume restante do balão volumétrico foi completado com água destilada. A densidade relativa à 20 °C/ 20 °C foi determinada com o auxílio de picnômetro, e a graduação alcoólica foi obtida a partir de tabela específica.

#### 4.2.5 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por gravimetria conforme método estabelecido pelo MAPA (BRASIL, 2016). Foram transferidos 25 mL de amostra para uma cápsula de porcelana previamente aquecida a  $500\text{ °C} \pm 25\text{ °C}$  por 1 hora, resfriado e pesado. A amostra foi seca em banho-maria, carbonizada em bico de Bunsen e levada à mufla a  $500\text{ °C} \pm 25\text{ °C}$  por 24 horas, até apresentar resíduo branco acinzentado. O cadinho, após resfriado em dessecador, foi pesado.

O resultado foi expresso em g/L conforme cálculo apresentado na Equação 3.

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

a = massa do cadinho com cinzas, em gramas

b = massa do cadinho, em gramas

#### 4.2.6 Extrato seco total e reduzido

O extrato seco total foi determinado por evaporação e secagem em estufa conforme método MAPA (BRASIL, 2016). Foram transferidas 25 mL da amostra para uma cápsula, previamente aquecida, resfriada em dessecador e pesada. A amostra foi evaporada em banho-maria a 100 °C por 3 horas consecutivas, em contato direto com o vapor produzido pelo banho. Em seguida, a cápsula foi mantida em estufa a 105 °C ± 3 °C por 30 minutos para completar a secagem. Após resfriada em dessecador a cápsula foi pesada para determinação do extrato seco total conforme cálculo apresentado na Equação 4.

$$40 \times (a-b) = \text{extrato seco total, em g/L} \quad [\text{Equação 4}]$$

a = massa da cápsula com extrato, em gramas

b = massa da cápsula, em gramas

O extrato seco reduzido foi determinado pelo valor do extrato seco total subtraído dos açúcares totais, e dos sulfatos que excedem 1 g por litro conforme cálculo apresentado na Equação 5.

$$ES-(A-1) - (S-1) = \text{extrato seco reduzido, em g/L} \quad [\text{Equação 5}]$$

ES = extrato seco total (g/L)

A = açúcares totais (g/L)

S = sulfatos totais (g/L) (esse termo será desprezado se seu valor for menor que 1 g/L)

#### 4.2.7 Açúcares totais

A análise de açúcares totais foi realizada pelo método Eynon Lane conforme estabelecido pelo MAPA (BRASIL, 2016). Para isso, 100 mL de amostra neutralizada com solução de hidróxido de sódio 5M foi reduzida em banho-maria a 25 mL para desalcoolizar e transferida para um balão volumétrico de 100 mL com 5 mL de solução saturada de acetato de chumbo e uma porção de carvão ativo para clarificação, e o volume do balão volumétrico foi completado com água destilada. A solução foi filtrada sobre 2,0 g de oxalato de sódio e 50 mL do filtrado foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL. 1 mL de ácido clorídrico concentrado foi adicionado e o balão foi aquecido em banho-maria a 67 °C – 70 °C por 15 minutos. Após esfriar, a solução foi neutralizada com carbonato de sódio 1M e o volume do balão volumétrico foi novamente completado com água destilada.

As titulações foram realizadas sobre a chapa aquecedora. O branco, constituído de solução de Soxhlet, água destilada e solução padrão de glicose 0,5%, foi titulado com solução padrão de glicose 0,5%, na presença de solução de azul de metileno, até ponto de viragem. A titulação prévia foi realizada com solução de Soxhlet, água destilada e amostrada preparada, titulado com solução padrão de glicose 0,5%, na presença de solução de azul de metileno, até ponto de viragem, sendo K o volume final de glicose gasto nessa titulação. A titulação da amostra foi realizada da mesma forma que a titulação prévia, porém transferindo K-1 mL de glicose imediatamente e dando sequência a titulação após retorno da ebulição.

O teor de açúcar total foi expresso em gramas de glicose por litro da amostra conforme cálculo apresentado na Equação 6.

$$\frac{(b-a) \times 5 \times f_1 \times f_2}{V} = \text{teor de açúcar total em glicose g/L} \quad [\text{Equação 6}]$$

b = Volume da solução de glicose gasto na titulação do branco, em mL.

a = Volume da solução de glicose gasto na titulação da amostra, em mL.

f 1 = Fator que envolve todas as diluições e as grandezas de massa ou volume usadas na tomada da amostra (1:2).

f 2 = Fator de conversão para expressão dos resultados em glicose (1,00).

V = Volume da amostra preparada usado na titulação, em mL.

#### 4.2.8 Sulfatos

Foi determinado pelo método aproximativo de Marty conforme apresentado pelo MAPA (BRASIL, 2016). Para isso, 10 mL de amostra foi pipetado em tubo de ensaio que foi aquecido em banho-maria por 30 minutos. Licor de Marty foi adicionado na quantidade de 5,0 mL, o tubo foi agitado, aquecido novamente em banho-maria por 5 minutos, resfriado e filtrado. O conteúdo filtrado foi igualmente dividido em dois tubos, e à primeira série de tubos foi adicionado 1 mL de cloreto de bário a 10% (m/V), e na segunda série de tubos foi adicionado ácido sulfúrico 1 N. O resultado foi obtido através de comparação de turbidez da solução com tabela específica e foi expresso em g/L de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ).

#### 4.2.9 Análise Estatística

Além da obtenção da média e do desvio padrão das amostras para cada atributo físico-químico, foi realizada análise de variância – ANOVA e teste de média - Tukey para comparação de média entre as marcas estudadas, a 5% de significância, com auxílio do software RStudio. O planejamento seguiu o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) e a ordem de análise das amostras foi sorteada.

### 4.3 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

#### 4.3.1 Preparação das Amostras

Um estudo de diluição prévia foi necessário para definir as melhores condições espectrais da análise. Foram testadas as diluições vinagre/água Milli-Q v/v nas proporções 1/10, 1/50, 1/100. A diluição 1/100, na qual a leitura de absorbância foi mais próxima de 1, foi a escolhida, garantindo assim menor interferência e melhor performance do equipamento. As amostras foram preparadas em duplicata.

#### 4.3.2 Análise UV-Vis

As análises foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV-2600. As amostras preparadas na diluição predefinida foram colocadas em cubetas de quartzo de 10 mm. A absorbância em função do comprimento de onda foi medida com a resolução de 2 nm no intervalo de leitura de 190 nm a 800 nm. A linha de base foi construída com água Milli-Q (RÍOS-REINA et al., 2019).

#### 4.3.3 Análise Estatística Multivariada

A ACP foi empregada para investigar as amostras de vinagre, o modelo foi construído utilizando a caixa de ferramenta *classification toolbox* para MATLAB (freeware) (BALLABIO; CONSONNI, 2013). O número de variáveis latentes foi determinado pelo procedimento de validação cruzada utilizando-se o método *leave-one-out*,<sup>1</sup>.

### 4.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

#### 4.4.1 Preparo das Amostras

Uma alíquota de 600 µL da amostra foi diluída com 50 µL de solução D<sub>2</sub>O (óxido de deutério; 99,9% de átomo D; Sigma-Aldrich), contendo 2.8 mM de TSP (trimetil-silil propionato de sódio; 98%; Sigma-Aldrich), e foi transferida para o tubo de vidro de 5 mm (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, Mo., EUA) para análise. As amostras foram preparadas em duplicata.

#### 4.4.2 RMN de <sup>1</sup>H das Amostras de Vinagre

Todos os espectros foram obtidos utilizando um espectrômetro Bruker Avance III de 9,4 T (400,13 MHz, frequência do <sup>1</sup>H), equipado com uma sonda

---

<sup>1</sup> É um caso específico do *k-fold*, com k igual ao número total de dados N

BBO (5 mm o.d.). Foi utilizada a sequência de pulso CPMG1D (Carr-Purcell-Meiboom-Gill, Bruker Library) empregando os seguintes parâmetros na aquisição dos espectros: largura espectral de 20 ppm, 50 k pontos digitalizados, tempo de aquisição igual a 3,4213 s, tempo de repetição de 2,00 s, temperatura de 298 K, e ganho ajustado automaticamente para cada amostra (PAPOTTI et al., 2015, adaptado).

O processamento dos espectros foi realizado no software TopSpin (v4.1.1, Bruker Biospin). Foram realizados os procedimentos de zero-filling para 64 k e apodização utilizando uma função exponencial com alargamento de linha igual a 1,0 Hz. Após a transformada de Fourier, a fase e a linha de base dos espectros foram corrigidas automaticamente, seguidas de ajustes manuais quando necessário. Os espectros foram referenciados com base no sinal do TSP (3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d4 acid sodium salt). Finalmente, os espectros foram exportados no formato ACSII.

#### 4.4.3 Análise Estatística Multivariada

A ACP foi empregada para investigar os dados obtidos por RMN de <sup>1</sup>H. O modelo ACP foi construído utilizando a caixa de ferramenta *classification toolbox* para MATLAB (freeware) (BALLABIO; CONSONNI, 2013). O número de variáveis latentes foi determinado pelo procedimento de validação cruzada utilizando-se o método leave-one-out.

### 4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)

A análise CLUE foi realizada com o objetivo de confirmar substâncias qualitativamente encontradas na análise de RMN, bem como, quantificar compostos considerados mais relevantes, na busca por relações quantitativas que pudessem indicar adulterações no vinagre de maçã.

#### 4.5.1 Preparo das Amostras

As amostras preparadas em duplicata foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1/20 (v/v) e filtradas em membranas Millipore de PVDF 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.2 Análise de CLUE

As análises foram realizadas utilizando um Cromatograma Líquido de ultra eficiência (CLUE) através de um Sistema Acquity (Waters®, Milford, EUA) equipado com injetor de agulha flow-through, sistema de bombeamento de solvente quaternário, módulo de aquecedor / resfriador de coluna, acoplado a detector DAD UV-Vis, controlado pelo Software Empower3®. Foi utilizada uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm X 50 mm). A água foi obtida pelo sistema Elga Purelab Option-Q (Veolia Water Technologies®, Saint-Maurice, França) e os padrões de ácido láctico e acético, compostos alvo para identificação e quantificação nessa análise, foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

A análise foi ajustada para detecção a 210 nm, eluição isocrática de tampão fosfato a 0,2 mL/min e volume de injeção de 1,4  $\mu\text{L}$  a temperatura ambiente, em duplicata. A fase móvel foi composta de tampão fosfato a pH 2,4, e a identificação dos ácidos foi baseada no tempo de retenção e no espectro de UV-vis (Liu et al., 2019, adaptado).

#### 4.5.3 Análise Estatística

A quantificação do ácido láctico e do ácido acético foi realizada através da equação de reta da curva analítica dos padrões, obtida com 6 pontos e medição realizada em triplicata. As médias foram comparadas por análise de variância – ANOVA e teste de média - Tukey a 5% de significância, com auxílio do software RStudio, utilizando Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) sendo blocada a repetição.

#### 4.6 PESQUISA DE CAMPO

#### 4.6.1 Questionário

A pesquisa de campo foi realizada através de questionário on-line, elaborado de forma clara e didática para levantar informações referentes ao: (1) consumo e principais características do consumidor de vinagre no Brasil; (2) o conhecimento do consumidor em relação à qualidade e fraude nos vinagres comercializados no Brasil.

O questionário foi composto de 14 questões de múltipla escolha, com duração média de 3 minutos. Os temas abordados foram: (1) indicadores socioeconômicos (2) consumo de vinagre (3) conhecimento em relação à qualidade e fraude em vinagres.

#### 4.6.2 Aplicação do Questionário

A aplicação do questionário foi on-line via plataforma do Google formulário respeitando o momento de distanciamento social requerido no país. A distribuição e divulgação foi realizada através das redes sociais de maior alcance: LinkedIn, Instagram, Facebook e WhatsApp, de forma a disseminar a pesquisa por todo o território nacional, e atingir aproximadamente 3.000 pessoas, com início em out/2020 e término em jun/2021.

O participante seguiu com o preenchimento do questionário após: (1) ser apresentado ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme Apêndice 1, que estava na página inicial do questionário, (2) sinalizar seu aceite em participar voluntariamente da pesquisa. Em caso de recusa da participação, a pesquisa era imediatamente finalizada. O projeto de pesquisa foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina – CEP/UEL.

#### 4.6.3 Análise Estatística

Os dados obtidos foram apresentados em formas gráficas pela plataforma Google formulários e os resultados foram utilizados para

contextualizar o conhecimento dos consumidores de vinagre em relação à qualidade e fraudes no produto.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

As análises físico-químicas foram realizadas nas amostras comerciais em dois lotes, e nas referências em lote único. Todas as amostras analisadas atenderam aos limites estabelecidos pela IN nº 6, de 3 de abril de 2012 do MAPA em todos os parâmetros especificados. Tais resultados confirmam o alinhamento dessas amostras, inclusive da referência fraudada, com o PIQ atualmente estabelecido aos fabricantes. Os resultados obtidos nas análises físico-químicas das amostras comerciais de vinagre de maçã e referências estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Resultados físico-químico das amostras de vinagre de maçã comerciais e referências estudadas.

<b>Amostra</b>	<b>Acidez volátil (g/100mL)</b>	<b>Álcool (%v/v)</b>	<b>Cinzas (g/L)</b>	<b>Extrato seco reduzido (g/L)</b>	<b>Açúcares totais (g/L)</b>	<b>Sulfatos (g/L)</b>
A	4,21±0,08 <sup>cd</sup>	0,18±0,04 <sup>bc</sup>	2,49±0,28 <sup>bc</sup>	13,26±0,73 <sup>bc</sup>	2,65±0,42 <sup>c</sup>	<1
B	4,38±0,09 <sup>c</sup>	0,35±0,02 <sup>a</sup>	2,04±0,08 <sup>cb</sup>	14,98±1,64 <sup>ab</sup>	2,68±0,24 <sup>c</sup>	<1
C	4,10±0,04 <sup>d</sup>	0,17±0,16 <sup>bc</sup>	1,81±0,07 <sup>d</sup>	15,44±3,41 <sup>ab</sup>	3,62±0,33 <sup>b</sup>	<1
D	4,58±0,11 <sup>b</sup>	0,32±0,10 <sup>ab</sup>	2,09±0,19 <sup>cd</sup>	15,92±0,25 <sup>ab</sup>	4,07±0,31 <sup>b</sup>	<1
E	4,28±0,15 <sup>cd</sup>	0,02±0,02 <sup>c</sup>	1,88±0,18 <sup>d</sup>	11,30±1,40 <sup>c</sup>	2,53±0,69 <sup>c</sup>	<1
RN	4,30±0,01 <sup>c</sup>	0,08±0,02 <sup>c</sup>	2,69±0,61 <sup>b</sup>	14,33±0,19 <sup>abc</sup>	5,20±0,10 <sup>a</sup>	<1
RF	6,83±0,04 <sup>a</sup>	0,13±0,03 <sup>c</sup>	3,24±0,29 <sup>a</sup>	17,13±0,23 <sup>a</sup>	5,23±0,06 <sup>a</sup>	<1

Média ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

**Fonte:** o próprio autor

Comparando as amostras estudadas, a amostra fraudada (RF) apresentou em média a maior acidez volátil, seguida da amostra D. Porém, o teor de acidez por si só não é um parâmetro adequado para identificação de fraude, visto que vinagres obtidos com maior concentração de ácido acético podem ter sua acidez ajustada através da adição de água para atender ao limite estabelecido de 4g/100mL no mínimo (Tabela 5).

As amostras D e B apresentaram o maior teor alcoólico e o maior teor de cinzas foi encontrado na amostra RF. Os menores conteúdos médios de extrato seco reduzido foram observados nas amostras A, E e RN, e com relação à quantidade de açúcares totais, as amostras RN e RF apresentaram as maiores concentrações médias (Tabela 5).

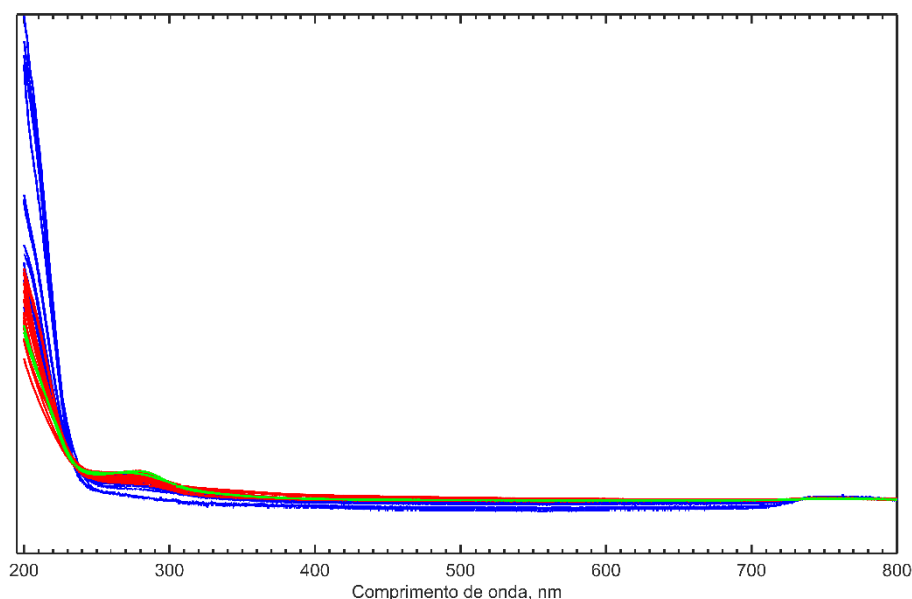
Fatores como o método de produção, o controle de pH, temperatura e oxigenação, assim como a escolha das culturas de fermentação afetam diretamente as características do vinagre. A cepa de levedura influencia na quantidade de álcool produzida, a manutenção do pH na faixa de 5,0-6,0 e da temperatura em 25-30 °C garantem o crescimento ótimo da bactéria acética, e o método empregado diferencia o tempo de conclusão do processo. Todos esses fatores estabelecem e/ou afetam diretamente a produção de ácido acético, principal alvo na fabricação de vinagre (HO et al., 2017).

Os resultados obtidos por meio da caracterização físico-química das amostras comerciais e referências (Tabela 5) reforçam a hipótese de que os parâmetros estabelecidos no PIQ não são suficientes para confirmar a integridade do vinagre e indicam a necessidade do uso de técnicas instrumentais que permitem aprofundar o conhecimento dos compostos dessa matriz em busca de possíveis adulterações.

## 5.2 ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS

Os espectros UV-vis foram coletados para 20 amostras de vinagre, obtidos em duplicata, sendo destas: 8 amostras de vinagre de álcool, 11 amostras de vinagre de maçã (5 comerciais, 5 adicionais e 1 referência não fraudada) e 1 amostra de referência fraudada (Figura 5).

**Figura 5:** Espectros UV-vis das amostras estudadas na região espectral de 200 a 800 nm.



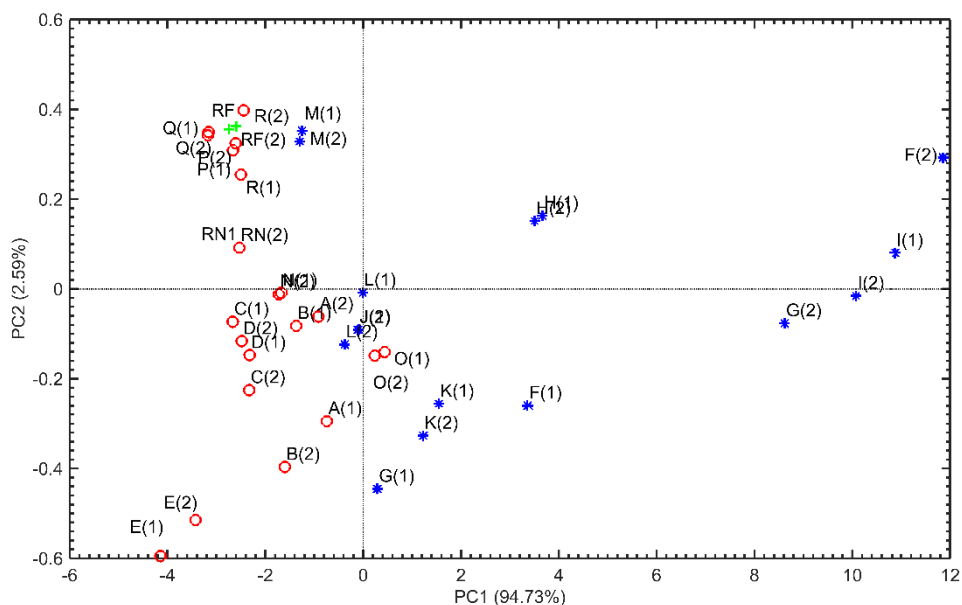
Legenda: — vinagre de maçã — vinagre de álcool — amostra fraudada.

**Fonte:** o próprio autor

A região do ultravioleta, foi a região de maior informação no espectro de vinagre, seja ele de maçã ou de álcool. Foram observadas duas bandas de absorção correspondendo ao cromóforo carbonila: uma banda de grande intensidade centrada em 200 nm associada a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  e outra banda de baixa intensidade centrada em 285 nm associada a transição  $n \rightarrow \pi^*$ . A simplicidade do espectro limita a quantidade de informações qualitativas fornecidas por essa técnica para matrizes alimentares (RÍOS-REINA et al., 2021).

Em seguida, a ACP foi aplicada para condensar a informação contida nos espectros e agrupar amostras similares, buscando uma diferenciação entre as amostras de vinagres de maçã, álcool e amostras fraudadas (Figuras 6 e 7).

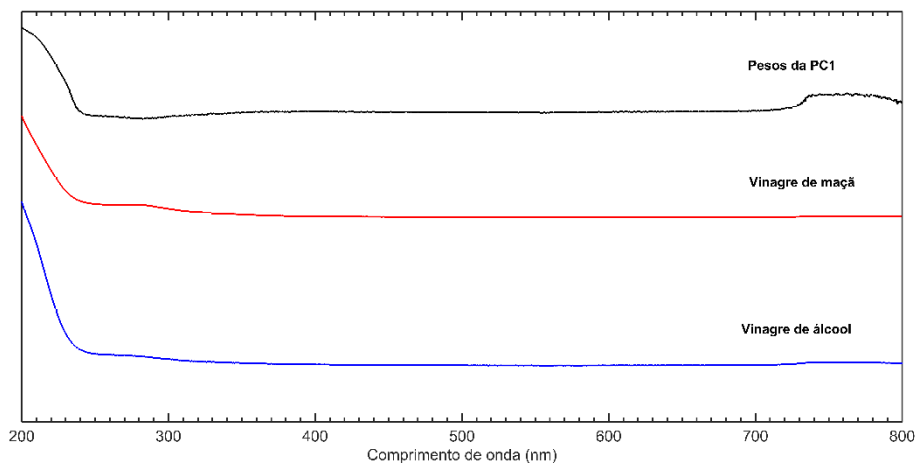
**Figura 6:** Gráfico de escore do modelo ACP para os dados UV-vis



Legenda: (○) vinagre de maçã (\*) vinagre de álcool (+) amostra fraudada.

Fonte: o próprio autor

**Figura 7:** Gráfico de pesos do modelo ACP para os dados UV-vis



Fonte: o próprio autor

A primeira componente principal explica 94,73% da variabilidade dos dados originais, enquanto a segunda explica 2,59%. Desta forma, o mapa perceptual bidimensional obtido, foi considerado adequado para avaliar as

relações entre as variáveis, uma vez que ele explica 97,32% da variabilidade dos dados originais (Figura 6).

O gráfico de escore (Figura 6) obtidos para as amostras, apresenta uma tendência de separação das amostras de vinagre de álcool e maçã. Amostras de vinagre de álcool (\*) obtiveram, em sua maioria, escore positivo na CP1, enquanto amostras de vinagre de maçã (o) obtiveram, em sua maioria, escore negativo ao longo dessa componente. Entretanto, a amostra fraudada (+), não apresentou valores que permitissem sua diferenciação sendo, nesse grupo de amostras, identificada como vinagre de maçã. Ressalta-se que esse resultado indicou apenas uma tendência de agrupamento, não sendo possível a realização de uma classificação precisa.

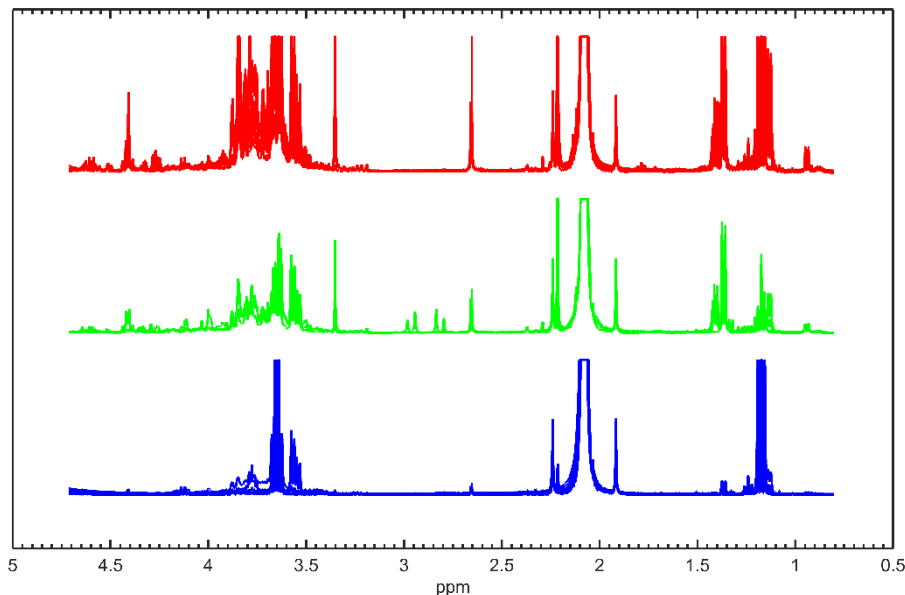
De acordo com o gráfico de pesos da CP1 (Figura 7), a banda de espectro centrada em 285 nm associadas a transição  $n \rightarrow \pi^*$  é a região mais informativa para discriminação das amostras. Como vários compostos são absorvidos nesta região do espectro, seriam necessárias análises adicionais para especificar os principais compostos relacionados à identificação dos vinagres de maçã e álcool.

O uso dos espectros de UV-vis como uma técnica simples e rápida para diferenciar tipos de vinagre é válido, conforme demonstrado por Ríos-Reina et al., (2019), que fazendo o uso de uma quantidade maior de amostras diferenciou o tempo de envelhecimento e a origem de diversos vinagres de vinho. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo indicam a necessidade do desenvolvimento de estudos mais amplos, com uma quantidade maior e mais diversificada de amostras para que seja possível desenvolver um modelo mais robusto.

### 5.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram coletados para 20 amostras de vinagre, obtidos em duplicata, sendo destas: 8 amostras de vinagre de álcool, 11 amostras de vinagre de maçã e 1 amostra fraudada (Figura 8).

**Figura 8:** Espectros RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de vinagre de maçã, álcool e fraudada.



Legenda: — vinagre de maçã — vinagre de álcool — amostra fraudada.

Fonte: o próprio autor

Os principais compostos identificados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Características dos sinais de  $^1\text{H}$  RMN,  $\delta$  (deslocamento químico) e  $J$  (constante de acoplamento) observável nos vinagres de maçã e álcool estudados.

$\delta$ (ppm)	Multip	$J$ (Hz)	Grupo identificador	Composto
0,94	d	7,0	$\text{CH}_3$	Valina
1,18	t	7,1	$\text{CH}_3$	Etanol
3,66	q	7,1	$\text{CH}_2$	Acetato de etila
1,24	t	7,1	$\text{CH}_3$	
4,14	q	7,1	$\text{CH}_2$	Ácido láctico
1,37	d	7,2	$\text{CH}_3$	
4,42	q	7,2	$\text{CH}_2$	Alanina
1,47	d	6,5	$\text{CH}_3$	
2,08	s	-	$\text{CH}_3$	Ácido acético
2,66	s	-	$\text{C}_2\text{H}_2 + \text{C}_3\text{H}_2$	Ácido succínico
3,36	s	-	$\text{CH}_3$	Metanol
3,55	m	-	$\text{CH}_2$	Glicerol
3,65	m	-	$\text{CH}_2$	
3,77	m	-	CH	

6,84	d	8,5	Ar (posição 2 e 6)	Tirosina
7,17	d	8,5	Ar (posição 3 e 5)	
7,31	m	-	Ar (posição 2 e 6)	Fenilalanina
7,38	m	-	Ar (posição 3,4 e 5)	
8,28	s	-	CH <sub>3</sub>	Ácido Fórmico

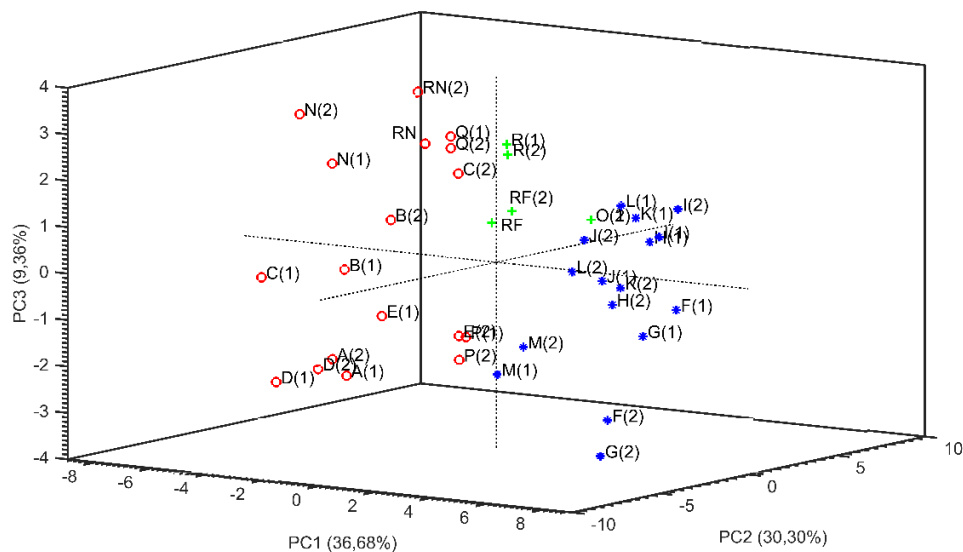
Legenda: s, singleto; d, duplete; t, tripleto; q, quarteto; m, mutipleteo.

Fonte: o próprio autor

Aminoácidos como a valina, alanina, tirosina e fenilalanina foram identificados nas amostras de vinagre de maçã, porém não foram encontrados nas amostras de vinagre de álcool. Assim como os ácidos láctico e succínico, e os álcoois metanol e glicerol. Conforme esperado, o ácido acético estava presente em todas as amostras e também foi observada a presença do ácido fórmico em ambos os tipos de vinagre. As amostras de vinagre de álcool apresentaram evidente presença de etanol residual e acetato de etila (Figura 8 e Tabela 6).

Esses resultados indicam que as amostras de vinagre de maçã apresentaram maior diversidade de composto em relação às amostras de vinagre de álcool, tal constatação era esperada tendo em vista a maior diversidade de compostos presentes no suco da maçã usado como matéria-prima para a fabricação desse vinagre em comparação a mistura hidroalcolica usada para obtenção do vinagre de álcool.

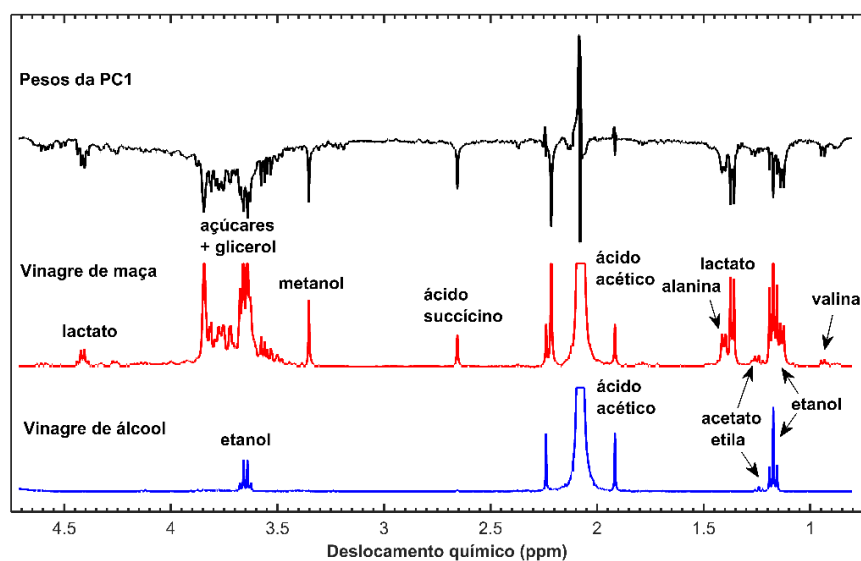
A ACP também foi aplicada para agrupar amostras similares, buscando uma diferenciação entre as amostras de vinagre de maçã, das amostras de vinagre de álcool e das possíveis amostras fraudadas. Os gráficos de escore e de pesos do modelo desenvolvido estão apresentados nas Figuras 9 e 10.

**Figura 9:** Gráfico de escore do modelo ACP para os dados de RMN de  $^1\text{H}$ 

Legenda: (○) vinagre de maçã (\*) vinagre de álcool (+) amostras fraudadas.

Fonte: o próprio autor

A primeira componente principal explica 36,68% da variabilidade dos dados originais, enquanto a segunda e a terceira explicam 30,30% e 9,36% respectivamente. Desta forma, o mapa perceptual tridimensional obtido, foi considerado adequado para avaliar as relações entre as variáveis, uma vez que ele explica 76,34% da variabilidade dos dados originais (Figura 9).

**Figura 10:** Gráfico de pesos do modelo ACP para os dados de RMN de  $^1\text{H}$ 

Fonte: o próprio autor

O modelo foi capaz de diferenciar amostras de vinagre de álcool e de maçã. As amostras de vinagres de álcool (\*) obtiveram escores positivos em CP1, enquanto as amostras de vinagre de maçã (o) obtiveram escores negativos. As amostras de vinagres de maçã com perfil fraudado (+), apresentaram valores próximos a zero ao longo de CP1, localizando-se entre as amostras de vinagres de álcool e maçã, como seria esperado para misturas dessas matérias-primas (Figura 9). O modelo identificou não apenas a referência fraudada (RF) como também indicou duas outras amostras (R e O) com o mesmo perfil adulterado.

O gráfico de pesos do modelo ACP (Figura 10) confirmou a contribuição dos compostos encontrados para a formação das CPs. Os sinais de etanol e acetato de etila foram prevalentes em amostras de vinagres de álcool, enquanto nas amostras de vinagres de maçã, foi identificado presença de alanina, valina, ácidos succínico e lático, metanol, glicerol e açúcares. Outros compostos como tirosina, fenilalanina e ácido fórmico também foram identificadas nas amostras de vinagre de maçã, porém devido à baixa intensidade dos sinais, não foram considerados na construção do modelo quimiométrico.

### 5.3.1 Estimativa da Concentração Relativa por RMN de <sup>1</sup>H.

Adicionalmente, os metabólitos destacados na análise quimiométrica foram submetidos à quantificação relativa por meio da integração dos sinais de interesse nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H. Para quantificação, o ácido acético foi utilizado como referência interna e sua concentração (mg/L) foi obtida por CLUE (método de referência, seção 4.5). Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Estimativa\* das concentrações de alguns metabólitos de interesse com base nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H.

	Valina (mg/L)	Etanol (mg/L)	Acetato de etila (mg/L)	Ácido Lático (mg/L)	Alanina (mg/L)	Ácido Acético** (mg/L)	Ácido Succínico (mg/L)	Metanol (mg/L)
Álcool	13,11 ± 25,68	1113,22 ± 1095,76	96,51 ± 78,72	62,83 ± 211,24	23,19 ± 23,11	49450,38 ± 16132,13	21,06 ± 35,06	11,24 ± 40,34
Maçã	93,99 ± 34,90	1065,69 ± 667,91	233,63 ± 113,37	1438,51 ± 532,65	556,28 ± 263,06	46010,71 ± 11083,78	204,91 ± 105,98	317,71 ± 116,37
Fraudada	104,04 ± 25,48	527,57 ± 206,59	124,54 ± 61,50	1236,13 ± 557,27	422,49 ± 345,77	71424,20 ± 13610,40	166,79 ± 54,06	196,82 ± 168,08
Valor p***								
Álcool x Maçã	< 0,01	0,88	0,00	< 0,01	< 0,01	0,36	< 0,01	< 0,01
Valor p								
Álcool x Fraudada	< 0,01	0,06	0,41	< 0,01	0,04	0,01	< 0,01	0,04
Valor p								
Maçã x Fraudada	0,46	0,01	0,01	0,46	0,41	< 0,01	0,27	0,15

\*Média ± desvio padrão. Por não ter sido realiza um estudo detalhado dos tempos de relaxação de cada composto, os resultados obtidos representam apenas uma estimativa da real concentração dos compostos nas amostras.

\*\*Os valores obtidos por CLUE (seção 5.4) foram utilizados como referência interna para quantificação dos demais compostos por RMN de <sup>1</sup>H.

\*\*\* O valor p foi obtido por meio do Teste-t de Student para amostras independentes. Valores de p < 0,05, indicam uma diferença significativa entre as médias.

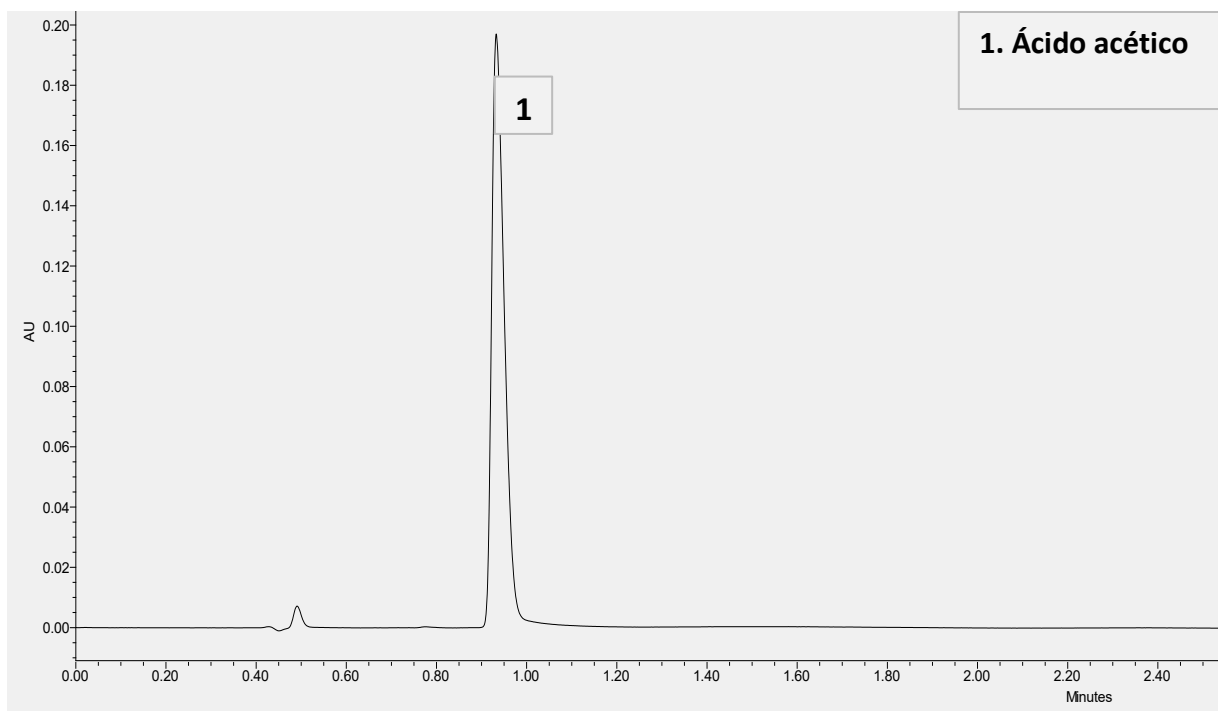
**Fonte:** o próprio autor

Os resultados da quantificação estimada pelos espectros de RMN  $^1\text{H}$  confirmaram que os valores médios de valina, alanina, ácido láctico, ácido succínico e metanol foram significativamente diferentes entre as amostras de álcool e maçã e as amostras de álcool e fraudadas, e não apresentaram diferença significativa para as amostras de maçã e fraudadas. Em contrapartida, os valores médios de etanol, acetato de etila e ácido acético foram os que apresentaram diferença na comparação entre as amostras de maçã e as amostras fraudadas (Tabela 7).

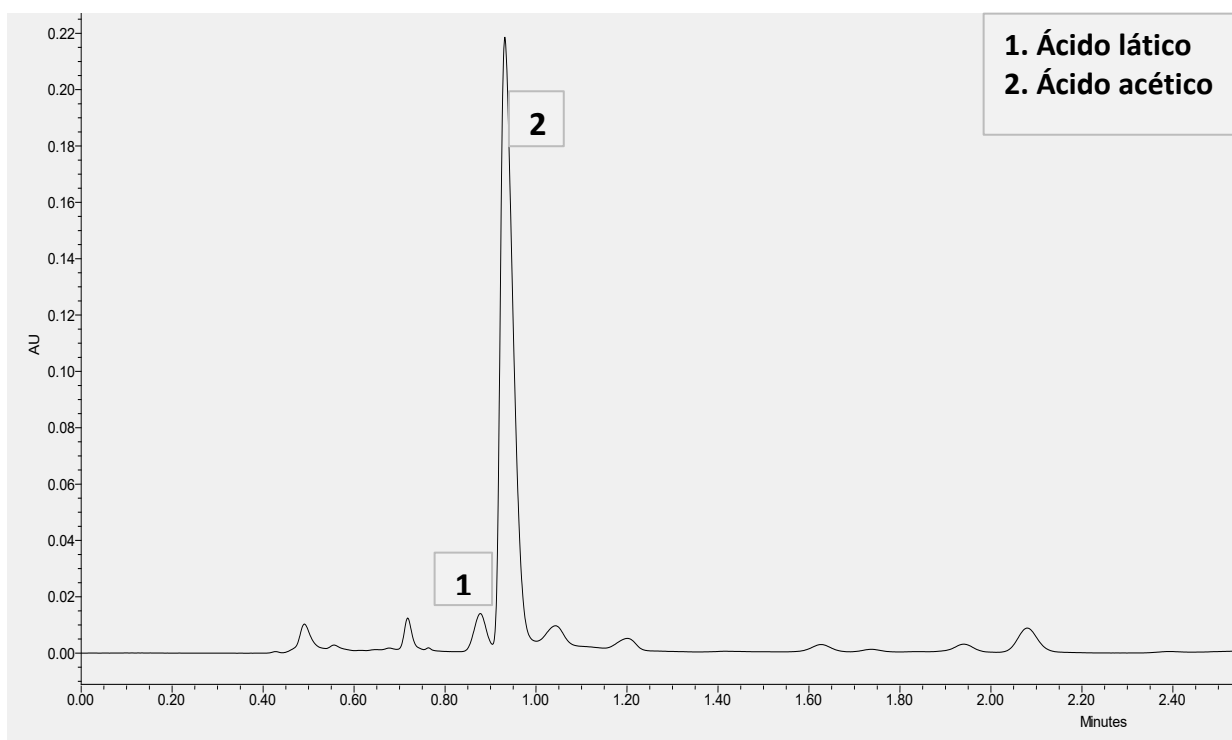
#### 5.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)

As amostras de vinagre de maçã e vinagre de álcool apresentaram cromatogramas distintos. Nas amostras de vinagre de álcool foi possível observar apenas um pico correspondente ao ácido acético (Figura 11). Por sua vez, nas amostras de vinagre de maçã mais de um pico foi visualizado, sendo identificados o ácido acético e o ácido láctico (Figura 12).

**Figura 11:** Cromatograma de uma amostra de vinagre de álcool



Fonte: o próprio autor

**Figura 12:** Cromatograma de uma amostra de vinagre de maçã

**Fonte:** o próprio autor

As curvas analíticas apresentaram (1) ácido láctico  $R^2 = 0,997$  com um limite de detecção (LD) de 6,25 mg/L e um limite de quantificação (LQ) de 20,84 mg/L; (2) ácido acético  $R^2 = 0,999$  com LD de 9,31 mg/L e LQ de 31,03 mg/L.

As quantidades de ácido láctico e acético quantificadas em todas as amostras de vinagre estudadas estão apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8:** \*Ácidos orgânicos quantificados por CLUE nas amostras de vinagre de maçã e álcool estudadas.

Amostra	Ácido láctico (mg/L)	Ácido acético (mg/L)
A	1.446,97 ± 177,24 <sup>ab</sup>	40.029,96 ± 575,59 <sup>jkl</sup>
B	2.588,65 ± 223,74 <sup>ab</sup>	43.663,31 ± 1.472,33 <sup>ghif</sup>
C	1.781,43 ± 1.962,14 <sup>ab</sup>	38.421,14 ± 226,50 <sup>kl</sup>
D	1.189,49 ± 154,84 <sup>ab</sup>	42.674,32 ± 206,35 <sup>ghif</sup>

E	1.583,96 ± 260,60 <sup>ab</sup>	42.333,46 ± 511,32 <sup>ghif</sup>
F	-	42.503,19 ± 2.576,30 <sup>ghif</sup>
G	-	44.880,42 ± 290,85 <sup>gh</sup>
H	-	48.951,29 ± 881,51 <sup>f</sup>
I	-	44.059,39 ± 364,75 <sup>ghi</sup>
J	-	46.123,32 ± 651,48 <sup>fg</sup>
K	-	74.226,00 ± 850,92 <sup>b</sup>
L	-	40.295,58 ± 293,05 <sup>ijkl</sup>
M	-	54.563,81 ± 760,54 <sup>e</sup>
N	3.360,44 ± 13,10 <sup>a</sup>	57.143,32 ± 546,10 <sup>de</sup>
O	1.202,31 ± 5,70 <sup>ab</sup>	88.767,07 ± 55,96 <sup>a</sup>
P	960,25 ± 6,72 <sup>ab</sup>	72.102,68 ± 254,15 <sup>b</sup>
Q	1468,76 ± 341,92 <sup>ab</sup>	36.450,13 ± 505,21 <sup>l</sup>
R	760,66 ± 177,10 <sup>b</sup>	60.541,16 ± 1996,81 <sup>d</sup>
RN	544,85 ± 20,98 <sup>b</sup>	41.278,07 ± 924,46 <sup>hijk</sup>
RF	2.840,41 ± 129,45 <sup>ab</sup>	64.964,38 ± 578,68 <sup>c</sup>

Legenda: A, B, C, D, E, N, O, P, Q e R – vinagres de maçã; F, G, H, I, J, K, L, M – vinagres de álcool; RN – referência de vinagre de maçã não fraudada; RF – referência de vinagre de maçã fraudada.

\*Média ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** o próprio autor

Assim como indicado de forma qualitativa na análise de RMN os vinagres de álcool não apresentaram quantidades detectáveis de ácido láctico. Entre os

vinagres de maçã, houve diferença significativa entre os valores médios da amostra N e das amostras RN e R (Tabela 8).

Como já mencionado, a composição final e as propriedades sensoriais do vinagre se alteram dependendo de sua matéria-prima, seu método de fabricação e sua diversidade microbiana. As bactérias dos gêneros *Acetobacter* e *Komagataeibacter* têm maior predomínio e atuação no processo de acidificação, pois têm maior tolerância ao ácido acético e ótima habilidade de conversão do etanol. Por sua vez, as bactérias do gênero *Gluconobacter* têm preferência pela oxidação da glicose e produzem outros compostos como o ácido glucônico. Com relação as técnicas de fabricação, no processo submerso onde as condições são controladas visando o maior rendimento, há uma seleção natural da cultura, mantendo apenas as espécies que se adaptam ao um ambiente mais estressante, enquanto o processo tradicional (*Orleans*) permite o desenvolvimento de uma cultura mais diversificada (ROMÁN-CAMACHO et al., 2020).

Liu e colaboradores (2019), também detectaram certa quantidade de ácido láctico em 2 amostras de vinagre de maçã chinesas, porém outras 12 amostras não apresentaram valores detectáveis. Em adição, esse estudo apresentou uma diversidade e complexidade da composição dos ácidos orgânicos presentes em 23 vinagres de fruta.

Nesse contexto, a matéria-prima representa apenas um entre os diversos fatores responsáveis pela composição final do vinagre. Tais fatores explicam a variação encontrada nas quantidades de ácido láctico das amostras de vinagre de maçã avaliadas, não sendo possível, estabelecer uma comparação direta entre elas e uma possível identificação de adulterantes com base apenas na quantificação desse composto.

Em relação às quantidades de ácido acético, seu limite mínimo de 4 g/100 mL é estabelecido pelo PIQ, porém ainda assim as amostras estudadas apresentaram diferenças significativas em média, variando entre 36.450,13 mg/L da amostra Q e 88.767,07 mg/L da amostra O. Também não foi possível identificar adulterações considerando apenas os valores de ácido acético ou sua relação com as quantidades de ácido láctico (Tabela 8).

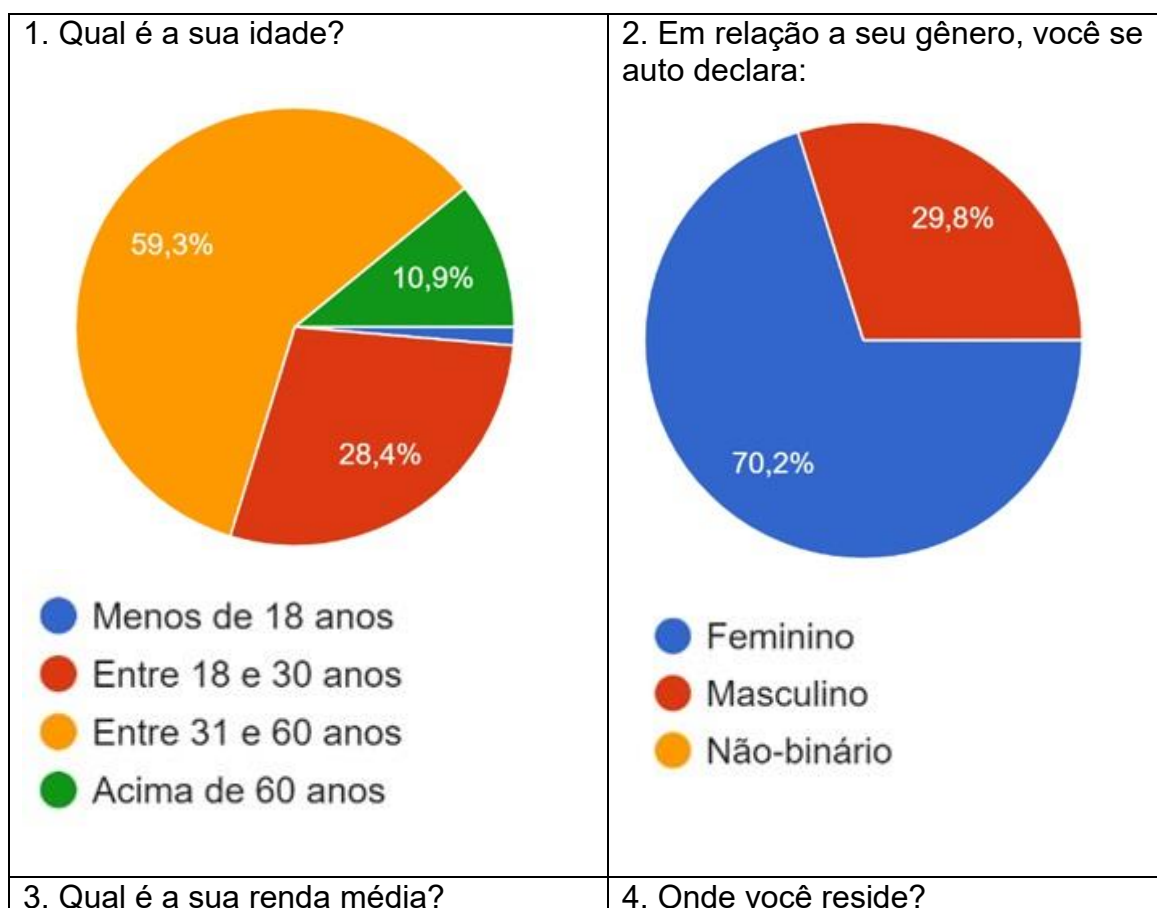
Esses resultados fortalecem a necessidade de técnicas não-direcionadas espectrais, capazes de determinar a composição química

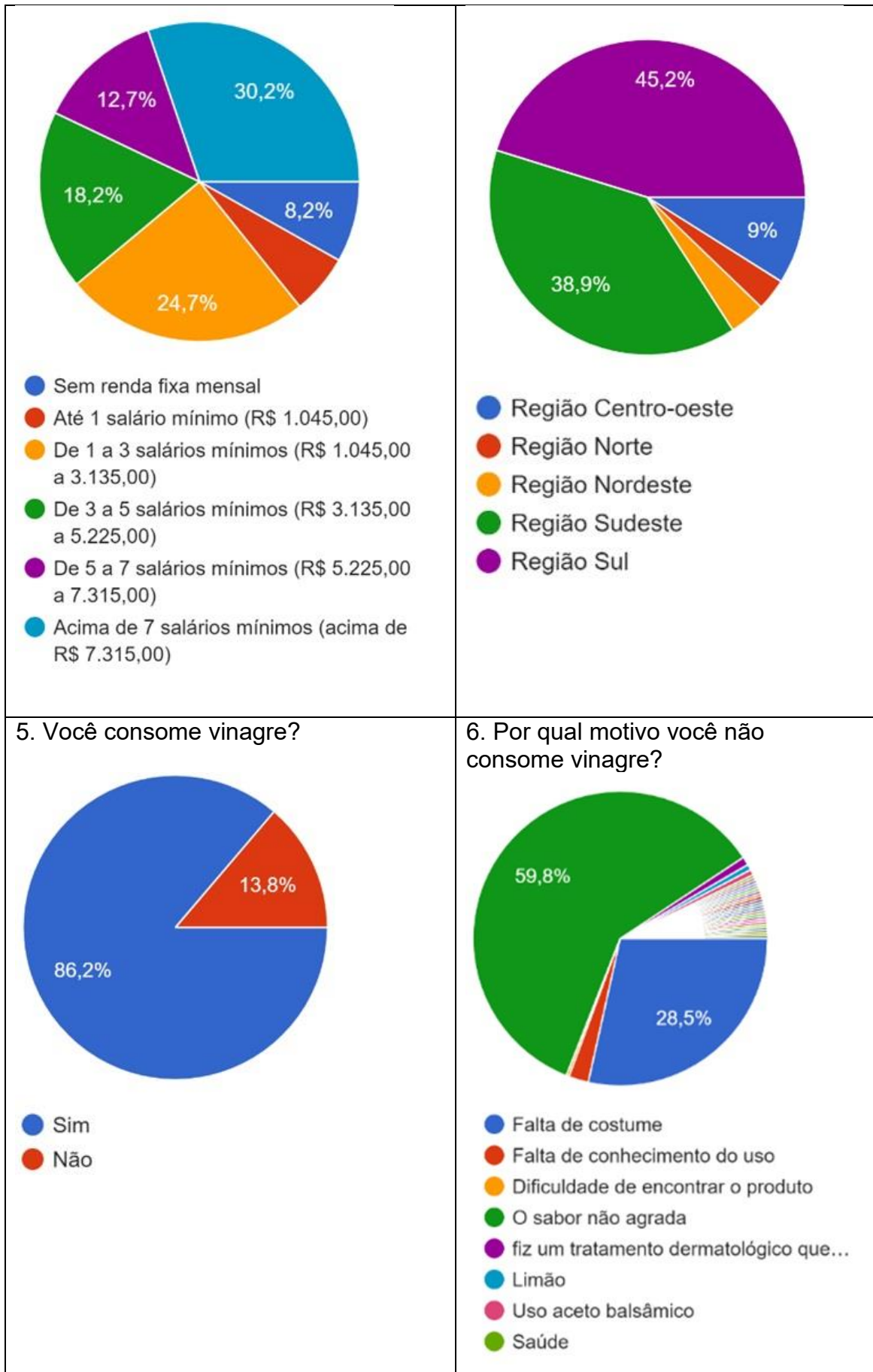
simultânea do alimento, aliadas à quimiometria, como ferramenta na detecção de adulterações.

## 5.5 PESQUISA DE CAMPO

A pesquisa questionou voluntários de todo o Brasil sobre seus hábitos de consumo de vinagre, sua preocupação com a qualidade desse produto e seu conhecimento sobre a prática de fraude no mercado de vinagre. Foram registradas 2346 respostas no período de out/2020 a jun/2021. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 13 e 14.

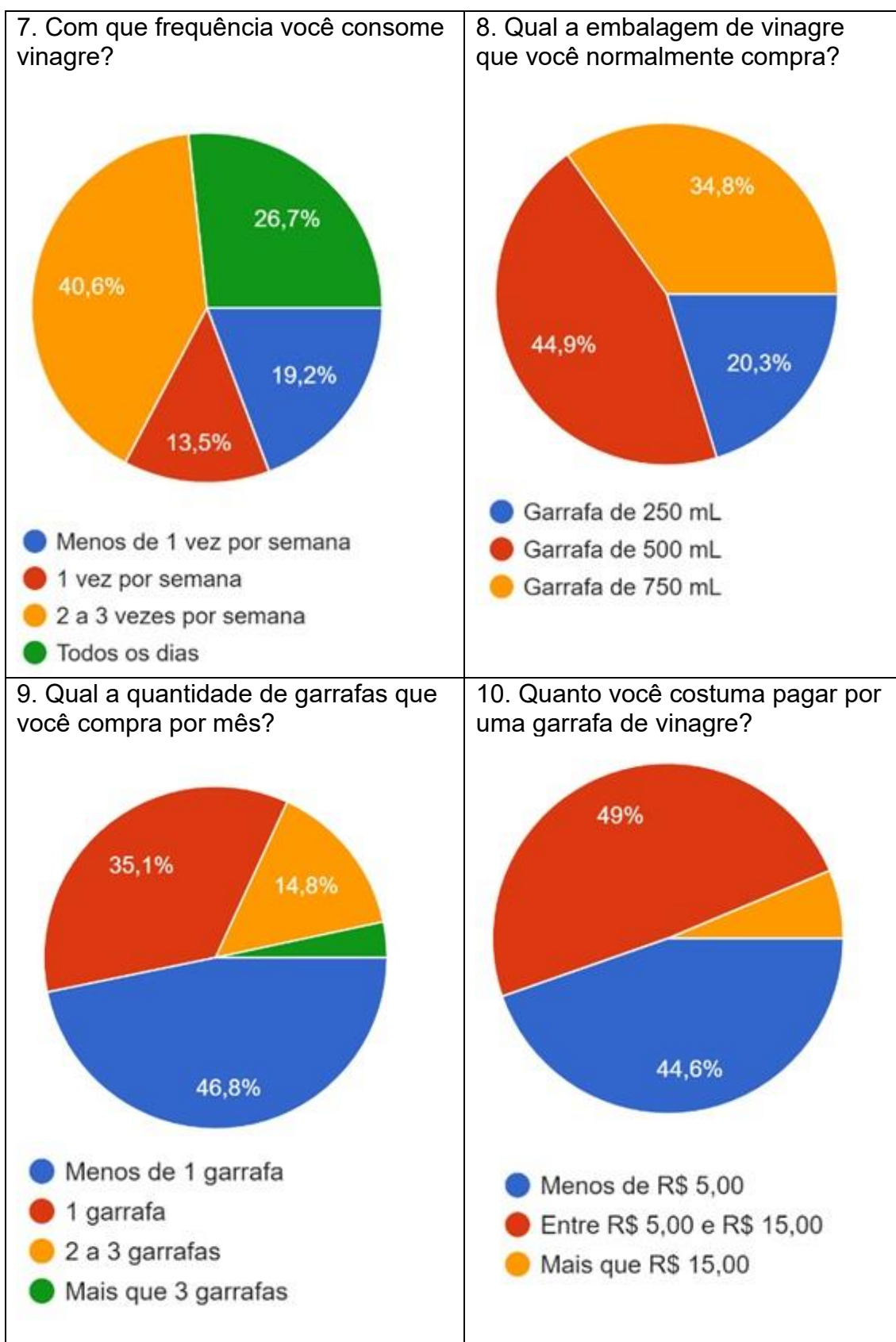
**Figura 13:** Caracterização dos participantes da pesquisa



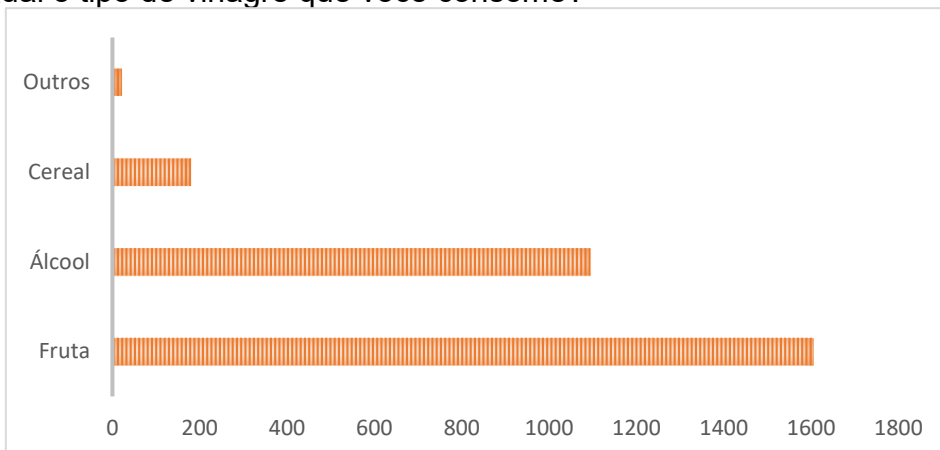


Fonte: o próprio autor

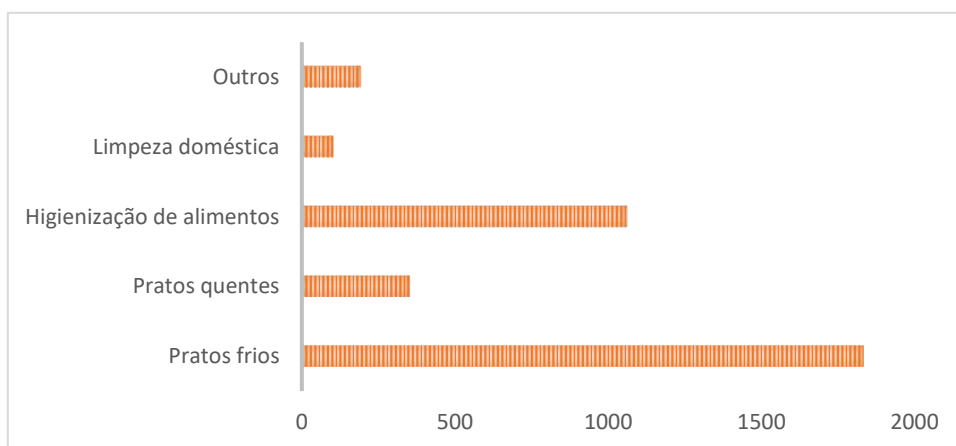
**Figura 14:** Dados de consumo de vinagre no Brasil



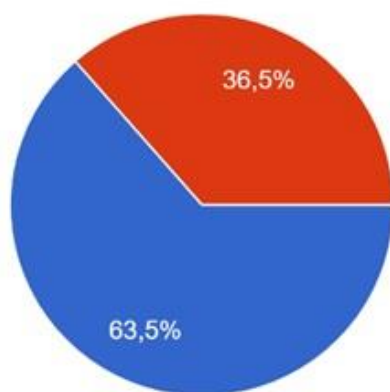
## 11. Qual o tipo de vinagre que você consome?



## 12. Como você costuma consumir o vinagre?

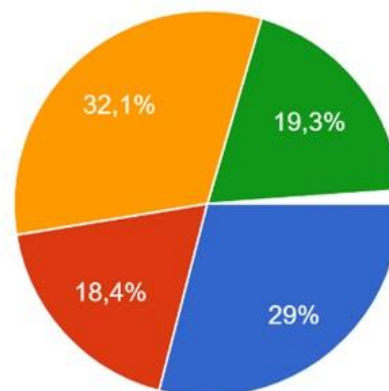


## 13. Você tem alguma preocupação com a qualidade do vinagre que consome?

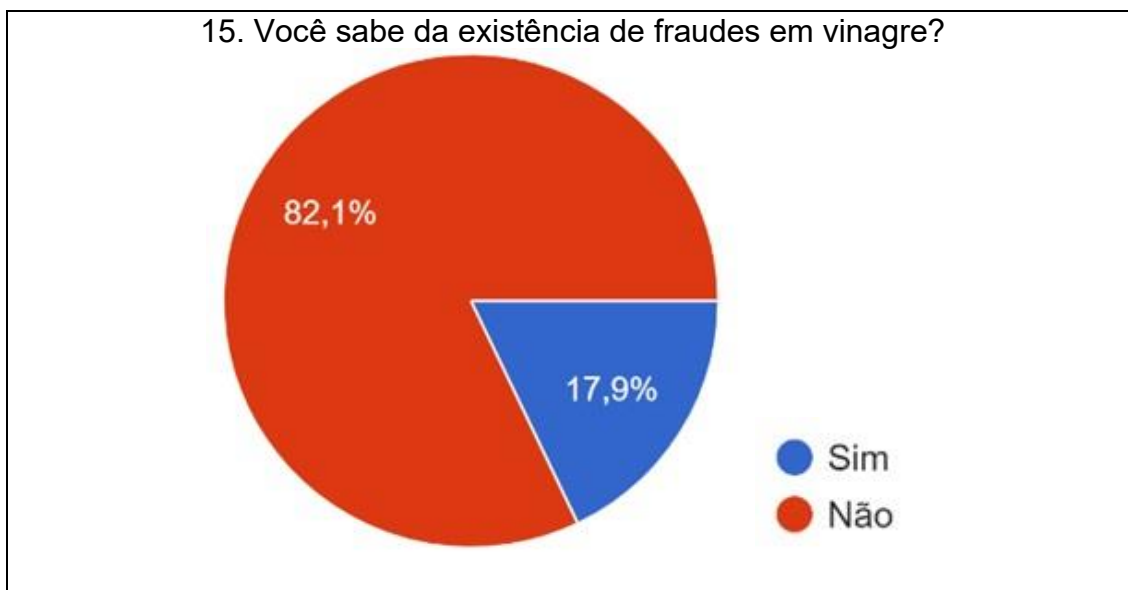


● Sim  
● Não

## 14. Qual a sua principal expectativa/busca ao comprar um vinagre?



● Marca conhecida  
● Preço acessível  
● Sabor agradável  
● Benefício à saúde  
● Em primeiro sabor e por segundo o pr...  
● Saúde, Limpeza  
● Dom spinosa  
● Qualidade e marca



Fonte: o próprio autor

A maioria dos participantes apresentou idade entre 31 e 60 anos, gênero feminino, renda acima de 7 salários mínimos e residência na região sul do país. Mais de 86% informou ser consumidor de vinagre, e para os não consumidores o maior motivo do não-consumo foi o sabor não agradar seguido da falta de costume (Figura 13).

Em relação ao consumo, a maior parte dos participantes indicou frequência de 2 a 3 vezes na semana, sendo adquirido menos de 1 garrafa (500 mL) por mês, a um valor entre R\$ 5,00 e R\$ 15,00. O vinagre de fruta foi eleito como o mais consumido seguido do vinagre de álcool, em sua maioria na condimentação de pratos frios e também na higienização de alimentos. Mais de 63% dos participantes demonstrou preocupação com a qualidade do vinagre que consome, indicando o sabor agradável e a marca conhecida como os principais pontos de procura. Por fim, mais de 82% dos participantes informou não saber da existência de fraude em vinagres (Figura 14).

## 6. CONCLUSÃO

Amostras de vinagre de maçã e de álcool foram quimicamente distinguidas por meio de técnicas espectroscópicas aliadas à quimiometria. Dentre as técnicas aplicadas, a  $^1\text{H}$ -RMN apresentou o resultado mais promissor pois, através da identificação simultânea de diversos compostos presentes em

cada amostra, como aminoácidos, ácidos orgânicos, ésteres e álcoois, estabeleceu três perfis distintos e permitiu a separação entre as amostras de vinagre de maçã, amostras de vinagre de álcool e amostras fraudadas.

A quantificação dos ácidos láctico e acético por CLUE confirmou a tendência qualitativa indicada nos espectros de RMN, onde o ácido láctico foi detectado apenas nos vinagres de maçã e não foi detectado nos vinagres de álcool. Porém, tais dados analisados de forma isolada não foram capazes de elucidar as amostras adulteradas.

Por fim, a análise dos espectros de Uv-vis, apesar de indicar uma direção de segregação entre as amostras de vinagre de maçã e álcool, não detectou a fraude para o grupo de amostras estudado. Por se tratar de uma técnica não específica na identificação dos compostos, onde mais de um metabólito pode apresentar absorvância em um mesmo comprimento de onda, faz-se necessária a utilização de um número maior de amostras para o desenvolvimento de modelos mais completos em estudos futuros.

Adicionalmente, por meio da pesquisa de campo foi possível obter informações atualizadas sobre o consumo de vinagre em diferentes regiões do país. Ressalta-se a não familiaridade do consumidor com a prática de fraude nesse tipo de produto, assim como sua busca por produtos de sabor agradável acima do preço acessível. Tais dados poderão auxiliar o setor no desenvolvimento de estratégias para expandir o mercado e alcançar novos perfis de consumidor.

Ao explorar técnicas não-direcionadas, de rápida e simplificada execução, sem necessidade de complexo preparo de amostra e que apresentam uma visão amplificada da composição química do produto, o presente trabalho abre caminho para o avanço das pesquisas brasileiras relacionadas à fraude em alimentos e estimula o aperfeiçoamento dos métodos em busca da viabilidade e disseminação destes à cadeia produtora, com conseqüente benefício ao consumidor.

## **7. ARTIGO CIENTÍFICO**

Aos Membros da Banca Examinadora de Defesa

Prezadas Professoras,

Na presente seção, segue o artigo intitulado “Instrumental analyzes as a tool to identify fraud in apple vinegar: exploratory study” que será encaminhado para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Informamos que o artigo foi redigido e preparado para possível submissão na revista científica *Food Control* no formato *short communication*. O guia de autores da referida revista foi disponibilizado na sequência, e adicionalmente, utilizamos o ‘American Psychological Association’ de referências conforme preconizado pela revista.

## 7.1 MANUSCRITO

# Instrumental analyzes as a tool to identify fraud in apple vinegar: exploratory study

PEREIRA, T. B.<sup>a</sup>; HENRIQUE-BANA, F. C.<sup>a</sup>; LOPES, T. I. B.<sup>b</sup>; MARESTONI, L. D.<sup>c</sup>; SPINOSA, W. A.<sup>a</sup>

[tatiele.borges@uel.br](mailto:tatiele.borges@uel.br); [ferchenrique@gmail.com](mailto:ferchenrique@gmail.com); [inacio\\_thiago@hotmail.com](mailto:inacio_thiago@hotmail.com);  
[wilma.spinosa@uel.br](mailto:wilma.spinosa@uel.br)\*

\*Corresponding autor. [wilma.spinosa@uel.br](mailto:wilma.spinosa@uel.br)

<sup>a</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

<sup>b</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>c</sup>Instituto Federal do Paraná, Londrina, Brazil

## Abstract

Food fraud events are no longer news, however due to the economic loss involved and the complexity of detection, they have become increasingly studied. Among the foods vulnerable to adulteration, vinegar stands out in the challenge of fraud detection, owing to the chemical complexity generated in fermentation process. The addition of lower-priced inputs, mainly from sugarcane, to apple vinegar puts the integrity of the product sold in Brazil at risk. Thus, the objective of this work was to evaluate apple vinegar samples by instrumental methods to detect possible fraud. Apple and white vinegar samples were purchased in local market and analyzed by UV-vis spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR), besides the development of exploratory chemometric models seeking to detect fraud. Finally, the quantification of organic acids was performed by Ultra-performance Liquid Chromatography (UPLC) to obtain their levels. The UV-vis analysis identified a trend to group the different these two types of vinegar, but it was not able to establish a precise classification. Otherwise, the <sup>1</sup>H-NMR data properly differentiated the apple vinegar samples from the white vinegar samples and established an intermediate profile for the adulterated samples. The lactic and acetic acid contents quantified by UPLC confirmed the information previously provided by <sup>1</sup>H-NMR spectra, however, an isolated evaluation of these acids did not contribute to the identification of fraud in these vinegars. The present work, explored non-targeted techniques, of fast and simplified execution and paved the way for future researches related to food fraud in Brazil. The improvement of the methods used here, can enable and spread these techniques to the production chain, and in turn directly benefit the consumer.

**Keywords:** adulteration; acetic fermentation; spectralprint; non-targeted.

## 1. Introduction

47 In the new global economy, food fraud has become a central issue for  
48 producers and consumers. Not only have surveys such as that conducted by  
49 (Spink et al., 2017) shown that food fraud is an emerging area of concern, but  
50 also that the risks involving this action need to be mitigated. Moreover, it has  
51 previously been established that food fraud is the intentional adulteration of food  
52 for financial gain, and it is a fact that this conduct can have a negative impact on  
53 the quality and safety aspects of foods and can also damage consumer  
54 confidence and harm food businesses (FAO, 2017).

55 The usage of unusual adulterants, which are unlikely to be detected using  
56 conventional analyzes, has resulted in the development of non-targeted testing  
57 able to detail the chemical structure of the entire food matrix, building a food  
58 fingerprint. Existing non-targeted techniques include Nuclear Magnetic  
59 Resonance (NMR), Near Infrared (NIR), Ultraviolet-visible (UV-vis) and  
60 chromatography methods (McGrath et al., 2018). Spectroscopic analytical  
61 methods followed by multivariate data analysis has been showing relevant results  
62 in determinate the chemical composition of complex matrices such as food,  
63 instantly and simultaneously (Callao & Ruisánchez, 2018), that (Ríos-Reina et  
64 al., 2021) proposed a new term to refer to this line of research named  
65 “spectralprint”.

66 Millennial and consumed worldwide, the vinegar, formerly handmade  
67 produced in a slow and traditional way, today, seeking greater yield and economic  
68 viability, is major produced by rapid submerged fermentation processes to attend  
69 its growing demand (Ríos-Reina et al., 2021). In general, any liquid with certain  
70 amount of acetic acid can be named as vinegar, in Brazil this value is legally  
71 determined as minimum 4g/100mL for most categories (Brasil, 2012a).  
72 Additionally, each category is established according to its raw material, so the  
73 fruit vinegar must be produced from fruit juice only (Brasil, 2012b), without any  
74 sugar from other sources added on (Brasil, 2020).

75 However, due to the climatic conditions required to cultivate fruits such as  
76 apple, the Brazilian apple crop is not as large as the apple vinegar market  
77 presence which lights up the hypothesis of adulteration of this product with more  
78 likely use of the most abundant source of sugar / alcohol in the country,  
79 sugarcane. Thus, the purpose of this study was to apply instrumental analyses

80 followed by multivariate data analysis in order to establish the spectralprint of  
81 apple and white vinegars looking for possible adulteration.

82

## 83 **2. Materials and Methods**

### 84 2.1 Vinegar samples

85

86 A total of 20 vinegar samples have been analyzed by duplicate: 11  
87 samples of apple vinegar (being 5 acquired from local market in the city of  
88 Londrina, Paraná state and 6 provided from a vinegar producer located in São  
89 Paulo state); 8 samples of white vinegar (being 2 acquired from same local  
90 market and 6 provided from the producer); and 1 sample knowingly adulterated  
91 also from the producer. The identification of the mentioned samples is shown in  
92 Table 1.

93

94 Table 1 – samples identification.

Sample	Identification
Apple vinegar	A, B, C, D, E, N, O, P, Q, R
White vinegar	F, G, H, I, J, K, L, M
Negative fraud reference	RN
Positive fraud reference	RF

95

### 96 2.2 UV-vis

#### 97 2.2.1 Sample preparation

98

99 Studied vinegar samples were diluted with ultrapure water in 1/100 (v/v)  
100 vinegar/water ratio aiming to optimize the spectral conditions.

101

#### 102 2.2.2 UV-vis analysis

103

104 The analyses were performed on the UV-Vis Shimadzu®  
105 spectrophotometer, model UV-2600. The samples were placed in 10 mm quartz  
106 cuvettes and the absorbance as a function of the wavelength was measured with

107 a resolution of 2 nm within the range of 190 nm to 800 nm (Ríos-Reina et al.,  
108 2019).

109

## 110 2.3 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

### 111 2.3.1 Sample preparation

112

113 A 600  $\mu$ L aliquot of the samples was diluted with 50  $\mu$ L of D<sub>2</sub>O solution  
114 (deuterium oxide; 99.9 % D atom; Sigma-Aldrich), containing 2.8 mM TSP  
115 (sodium trimethylsilyl propionate; 98 %; Sigma -Aldrich), and was transferred to  
116 a 5 mm NMR glass tube (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, Mo., USA) for analysis.

117

### 118 2.3.2 NMR analysis

119

120 <sup>1</sup>H-NMR spectra were acquired with a Bruker 400 MHz Avance III  
121 spectrometer (400.13 MHz, <sup>1</sup>H frequency, Bruker BioSpin, Germany). The Bruker  
122 spin-echo sequence “cpmg1d” (Carr-Purcell-Meiboom-Gill, Bruker Library) was  
123 used, applying the following acquisition parameters: spectral width of 8012.8 Hz,  
124 50 k (number of data points), acquisition time of 3.4213 s, delay time of 2.00 s,  
125 temperature of 298 K, and gain automatically adjusted for each sample (Papotti  
126 et al., 2015, adapted).

127 Spectral preprocessing was performed using TopSpin software (v4.1.1,  
128 Bruker Biospin). Zero-filling was procedures for 64 k and apodization were  
129 performed using an exponential function with line broadening equal to 1.0 Hz.  
130 then converted into a frequency domain spectrum by Fourier transform, the phase  
131 and baseline of the spectra were automatically corrected, followed by manual  
132 adjustments when necessary. The spectra were calibrated using the TSP signal  
133 (3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d<sub>4</sub> acid sodium salt). Finally, the spectra were  
134 exported in ACSII format.

135

## 136 2.4 Data Analysis

137

138 Principal component analysis (PCA) was applied to investigate the vinegar  
139 samples for both UV-vis and NMR spectra results. The model was built by using  
140 the classification toolbox for MATLAB (freeware) (Ballabio & Consonni, 2013).

141 The number of latent variables was determined by the cross-validation procedure  
142 using the leave-one-out method.

143

## 144 2.5 Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UPLC)

### 145 2.5.1 Sample preparation

146

147 The samples were diluted with ultrapure water in 1/20 (v/v) vinegar/water  
148 ratio and filtered by Millipore 0.22  $\mu\text{m}$  PVDF membranes. The water was obtained  
149 by the Elga Purelab Option-Q system (Veolia Water Technologies®, Saint-  
150 Maurice, France) and the lactic and acetic acid standards, target compounds for  
151 identification and quantification in this analysis, were acquired from Sigma-  
152 Aldrich.

153

### 154 2.5.2 UPLC analysis

155

156 UPLC equipment was used to analyze lactic and acetic acid in all studied  
157 samples through an Acquity System (Waters®, Milford, USA) equipped with a  
158 flow-through needle injector, quaternary solvent pumping system, coupled to a  
159 DAD UV-Vis detector, controlled by Empower3® Software.

160 An ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å column (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm X  
161 50 mm) was used to conducted the separation in isocratic elution with a mobile  
162 phase of monopotassium phosphate buffer solution (pH = 2.4), the injection  
163 volume was 1.4  $\mu\text{L}$  and the flow rate was 0.2 mL/min, at room temperature. The  
164 spectra were recorded at 210 nm and the acids identification and quantification  
165 was based on retention time and peak area with aid of a 6-point analytical curve  
166 measured in triplicate (Liu et al., 2019, adapted).

167

## 168 **3. Results and discussion**

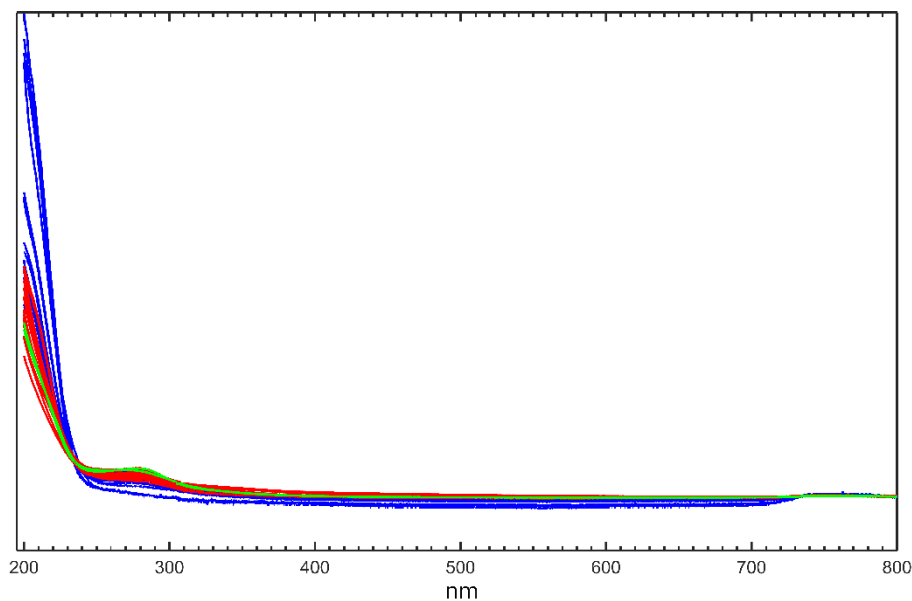
### 169 3.1 UV-vis

170

171 The UV-vis spectra collected is shown in Figure 1.

172

173 Figure 1: UV-vis spectra of vinegar samples in the spectral region from 200 to  
174 800 nm.



175

176 Legend: — apple vinegar — white vinegar — positive fraud reference.

177

178 The main information in both types of vinegar was observed in ultraviolet  
179 region. Two absorption bands corresponding to the carbonyl chromophore were  
180 perceived: a high intensity band centered at 200 nm associated with the  $\pi \rightarrow \pi^*$   
181 transition and another low intensity band centered at 285 nm associated with the  
182  $n \rightarrow \pi^*$  transition. However, the simplicity of the spectrum limits the amount of  
183 qualitative information provided by this technique for food matrices (Ríos-Reina  
184 et al., 2021).

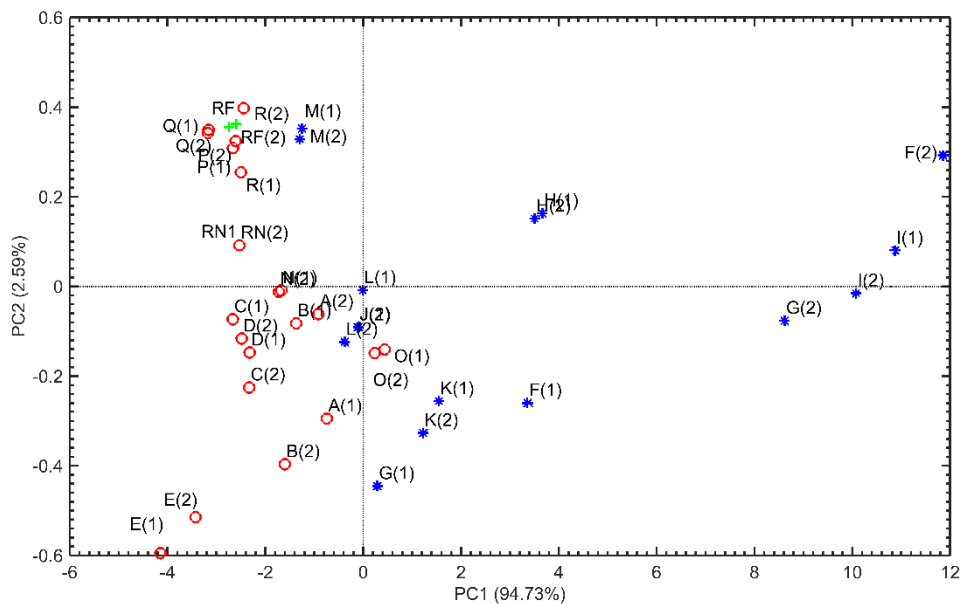
185

186 Principal Component Analysis (PCA) was applied to condense the spectra  
187 information into the Principal Components (PCs) and to group similar samples, in  
188 order to explore differences among apple vinegar, white vinegar and possible  
189 adulterated vinegar (Figures 2 and 3).

189

190

Figure 2: PCA scores plot related to UV-vis spectra.



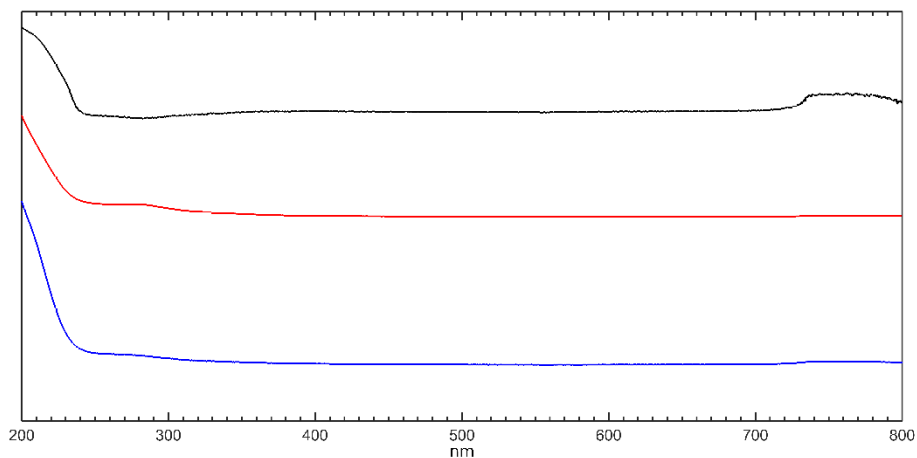
191

192 Legend: (●) apple vinegar (\*) white vinegar (+) positive fraud reference.

193

194

Figure 3: PCA loadings plot related to UV-vis spectra.



195

196 Legend: — apple vinegar — white vinegar — PC1.

197

198 As shown in the score plot (Figure 2), the first and the second PCs have  
 199 explained 97.32% of total variance and it has presented a tendency to separate  
 200 the samples of apple and white vinegar. White vinegar samples presented mostly  
 201 positive scores on PC1, while apple vinegar samples presented mostly negative  
 202 scores along this component. However, the positive fraud reference did not  
 203 present distinct values, being, in this group of samples, identified as apple

204 vinegar. It is important to highlight, that these results indicated only a grouping  
205 tendency and it was not possible to carry out a precise classification.

206 According to the loadings plot of PC1 (Figure 3) the main difference  
207 between apple and white vinegars were explained by the spectra band centered  
208 at 285 nm. As several compounds absorb in this region of the spectrum it would  
209 be necessary additional analyses to specify the main compounds related to the  
210 identification of these types of vinegars.

211 The use of UV-vis spectra as a simple and fast technique to differentiate  
212 types of vinegar is valid, as demonstrated by (Ríos-Reina et al., 2019), who  
213 distinguished the aging and the origin of several wine vinegars using a high  
214 number of samples. However, the results obtained in this study indicate the  
215 requirement to development more studies, with a larger and more diversified  
216 number of samples in order to identify adulterated apple vinegar by means of this  
217 technique.

218

### 219 3.2 NMR

220

221 The main metabolites identified in the  $^1\text{H}$  NMR spectra are shown in Table  
222 2.

223

224 Table 2. Metabolites and  $^1\text{H}$  chemical shifts identified in vinegar samples.

$\delta$ (ppm)	Multiplicity	$J$ (Hz)	Group	Metabolites
0.94	D	7.0	$\text{CH}_3$	Valine
1.18	T	7.1	$\text{CH}_3$	Ethanol
3.66	Q	7.1	$\text{CH}_2$	Ethyl acetate
1.24	T	7.1	$\text{CH}_3$	
4.14	Q	7.1	$\text{CH}_2$	Lactic acid
1.37	D	7.2	$\text{CH}_3$	
4.42	Q	7.2	$\text{CH}_2$	Alanine
1.47	D	6.5	$\text{CH}_3$	
2.08	S	-	$\text{CH}_3$	Acetic acid
2.66	S	-	$\text{C}_2\text{H}_2$ $\text{C}_3\text{H}_2$	Succinic acid
3.36	S	-	$\text{CH}_3$	Methanol
3.55	M	-	$\text{CH}_2$	Glycerol
3.65	M	-	$\text{CH}_2$	
3.77	M	-	CH	
6.84	D	8.5	Aromatic (positions 2 and 6)	Tyrosine
7.17	D	8.5	Aromatic (positions 3 and 5)	
7.31	M	-	Aromatic (positions 2 and 6)	Phenylalanine
7.38	M	-	Aromatic (positions 3,4 and 5)	

8.28	S	-	CH <sub>3</sub>	Formic acid
------	---	---	-----------------	-------------

Peak multiplicities: S, singlet; D, doublet; T, triplet; M, multiplet.

226

227 Amino acids such as valine, alanine, tyrosine and phenylalanine were  
 228 identified in the apple vinegar samples, but they were not found in the white  
 229 vinegar samples. As well as lactic and succinic acids, and methanol and glycerol  
 230 alcohols. As expected, acetic acid was present in all samples and the presence  
 231 of formic acid was also observed in both types of vinegar. The white vinegar  
 232 samples showed an evident presence of residual ethanol and ethyl acetate (Table  
 233 2).

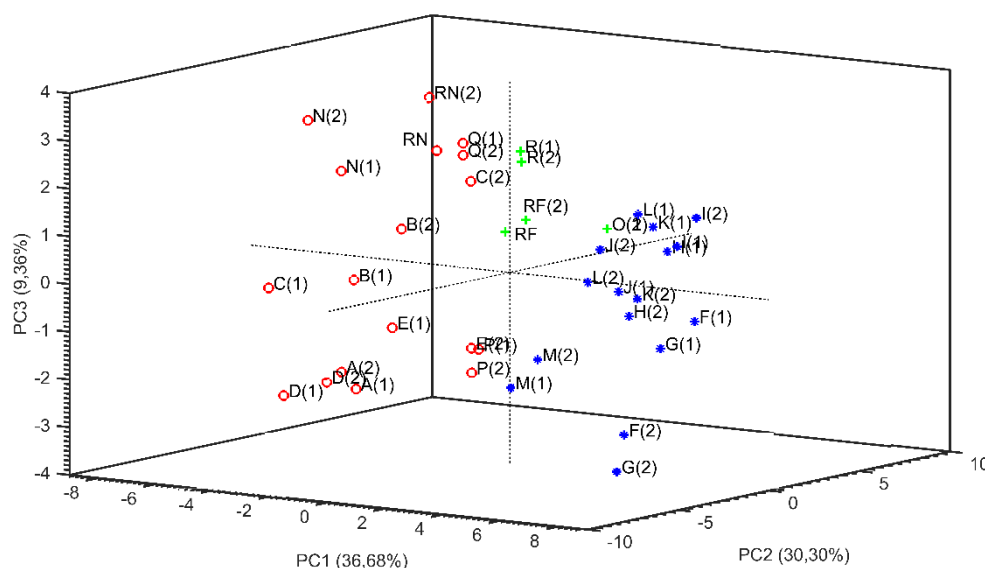
234 These results indicate that apple vinegar presented a higher diversity of  
 235 metabolites compared to white vinegar, such finding was expected given the  
 236 greater diversity of compounds present in the apple juice used as raw material to  
 237 produce this vinegar compared to the hydroalcoholic mixture used to obtain the  
 238 white vinegar.

239 PCA was also applied to group similar samples, seeking a differentiation  
 240 among apple vinegar, white vinegar and possible adulterated samples. The score  
 241 and loading plots are shown in Figures 4 and 5.

242

243

Figure 4: PCA scores plot related to NMR spectra.



244

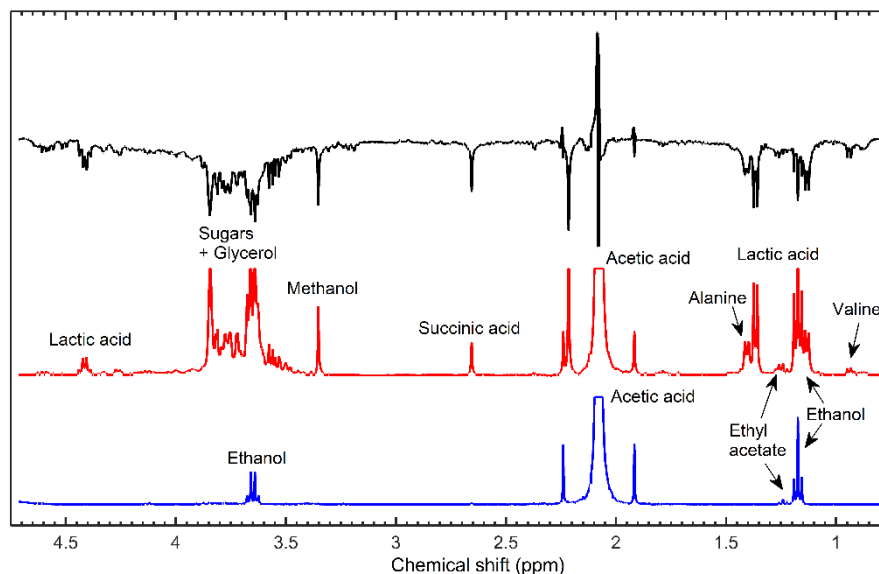
245 Legend: (○) apple vinegar (\*) white vinegar (+) positive fraud samples.

246

247

248

Figure 5: PCA loadings plot related to NMR spectra.



249

250 Legend: — apple vinegar — white vinegar — PC1.

251

252 The scores plot of the first and the three principal components (PCs), that  
 253 explained 76.34%% of total variance, showed a trend of grouping the apple  
 254 vinegar and white vinegar samples. Thus, white vinegars were placed in the  
 255 positive side of PC1, whereas the apple vinegars were in the negative side of  
 256 PC1. On the other hand, the samples of apple vinegar related with fraud  
 257 presented values close to zero along PC1, being located between the samples  
 258 of white and apple vinegar, as would be expected for mixtures of these raw  
 259 materials (Figure 4). The model identified not only the positive fraud reference as  
 260 also indicated two other samples (R and O) with the same adulterated profile.

261 The loading plot (Figure 5) confirmed the contribution of the compounds  
 262 found to the formation of CPs. Ethanol and ethyl acetate signs were prevalent in  
 263 white vinegar samples, while in apple vinegar samples, amounts of alanine,  
 264 valine, succinic and lactic acid, methanol, glycerol and sugars were identified.  
 265 Other compounds such as tyrosine, phenylalanine and formic acid were also  
 266 identified in the apple vinegar samples, but due to the low intensity of the signals,  
 267 they were not considered in the construction of the chemometric model.

268 Additionally, the metabolites highlighted in the chemometric analysis were  
 269 subjected to relative quantification through the integration of their signals in the  
 270  $^1\text{H}$  NMR spectra. For quantification, acetic acid was used as an internal reference

271 and its concentration (mg/L) was obtained by UPLC (reference method, section  
272 2.4). The results are shown in Table 3.

273 Table 3. Concentration estimated\* of the metabolites of interest identified in vinegar samples based on <sup>1</sup>H NMR spectra.

	<b>Valine (mg/L)</b>	<b>Ethanol (mg/L)</b>	<b>Ethyl acetate (mg/L)</b>	<b>Lactic acid (mg/L)</b>	<b>Alanine (mg/L)</b>	<b>Acetic acid** (mg/L)</b>	<b>Succinic acid (mg/L)</b>	<b>Methanol (mg/L)</b>
White vinegar	13,11 ± 25,68	1113,22 ± 1095,76	96,51 ± 78,72	62,83 ± 211,24	23,19 ± 23,11	49450,38 ± 16132,13	21,06 ± 35,06	11,24 ± 40,34
Apple vinegar	93,99 ± 34,90	1065,69 ± 667,91	233,63 ± 113,37	1438,51 ± 532,65	556,28 ± 263,06	46010,71 ± 11083,78	204,91 ± 105,98	317,71 ± 116,37
Adulterated vinegar	104,04 ± 25,48	527,57 ± 206,59	124,54 ± 61,50	1236,13 ± 557,27	422,49 ± 345,77	71424,20 ± 13610,40	166,79 ± 54,06	196,82 ± 168,08
p-value***								
White x Apple	< 0,01	0,88	0,00	< 0,01	< 0,01	0,36	< 0,01	< 0,01
Adulterated x White	< 0,01	0,06	0,41	< 0,01	0,04	0,01	< 0,01	0,04
Adulterated x Apple	0,46	0,01	0,01	0,46	0,41	< 0,01	0,27	0,15

274 Results are mean values ± SD.

275 \*Since a detailed study of the relaxation times of each compound was not carried out, the results obtained represent only an estimate of the actual concentration  
276 of these compounds in the samples.

277 \*\*The values obtained by UPLC (section 3.3) were used as an internal reference for quantification of the other compounds by <sup>1</sup>H NMR.

278 \*\*\* The p-value was obtained using Student's t-test for independent samples. Values of p &lt; 0.05 indicate a significant difference among the means.

279 The values estimated by <sup>1</sup>H NMR spectra confirmed that the mean values  
 280 of valine, alanine, lactic acid, succinic acid and methanol were significantly  
 281 different between the white and apple samples and the white and adulterated  
 282 samples, and showed no significant difference for apple and adulterated  
 283 samples. On the other hand, the mean values of ethanol, ethyl acetate and acetic  
 284 acid were the ones that presented difference comparing apple and adulterated  
 285 samples (Table 3).

286

## 287 3.3 UPLC

288

289 The contents of lactic and acetic acid quantified in all studied vinegar  
 290 samples are shown in Table 4.

291

292 Table 4. Lactic and acetic acid contents in apple and white vinegars.

<b>Samples</b>	<b>Lactic acid (mg/L)</b>	<b>Acetic acid (mg/L)</b>
A	1.446,97 ± 177,24 <sup>ab</sup>	40.029,96 ± 575,59 <sup>jkl</sup>
B	2.588,65 ± 223,74 <sup>ab</sup>	43.663,31 ± 1.472,33 <sup>ghif</sup>
C	1.781,43 ± 1.962,14 <sup>ab</sup>	38.421,14 ± 226,50 <sup>kl</sup>
D	1.189,49 ± 154,84 <sup>ab</sup>	42.674,32 ± 206,35 <sup>ghif</sup>
E	1.583,96 ± 260,60 <sup>ab</sup>	42.333,46 ± 511,32 <sup>ghif</sup>
F	-	42.503,19 ± 2.576,30 <sup>ghif</sup>
G	-	44.880,42 ± 290,85 <sup>gh</sup>
H	-	48.951,29 ± 881,51 <sup>f</sup>
I	-	44.059,39 ± 364,75 <sup>ghi</sup>
J	-	46.123,32 ± 651,48 <sup>fg</sup>
K	-	74.226,00 ± 850,92 <sup>b</sup>
L	-	40.295,58 ± 293,05 <sup>ijkl</sup>
M	-	54.563,81 ± 760,54 <sup>e</sup>
N	3.360,44 ± 13,10 <sup>a</sup>	57.143,32 ± 546,10 <sup>de</sup>
O	1.202,31 ± 5,70 <sup>ab</sup>	88.767,07 ± 55,96 <sup>a</sup>
P	960,25 ± 6,72 <sup>ab</sup>	72.102,68 ± 254,15 <sup>b</sup>
Q	1468,76 ± 341,92 <sup>ab</sup>	36.450,13 ± 505,21 <sup>l</sup>

R	760,66 ± 177,10 <sup>b</sup>	60.541,16 ± 1996,81 <sup>d</sup>
RN	544,85 ± 20,98 <sup>b</sup>	41.278,07 ± 924,46 <sup>hijk</sup>
RF	2.840,41 ± 129,45 <sup>ab</sup>	64.964,38 ± 578,68 <sup>c</sup>

293 Results are mean values ± SD from two measurements; means in the same column with  
 294 superscript with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

295

296 As qualitatively indicated in the NMR analysis, white vinegars did not  
 297 present detectable amounts of lactic acid in UPLC either. Among the apple  
 298 vinegars, there was significant difference between sample N and samples RN  
 299 and R, in average (Table 4).

300 The chemical composition and consequent quality of the vinegars depends  
 301 on its raw material, its manufacturing method and its microbial diversity. For  
 302 example, acetic acid bacteria (AAB) from the genera *Acetobacter* and  
 303 *Komagataeibacter* have higher predominance and performance in the  
 304 acidification process, as they have greater tolerance to acetic acid and excellent  
 305 ability to convert ethanol, while the *Gluconobacter* genus has a preference for  
 306 glucose oxidation and produce other compounds such as gluconic acid. With  
 307 regards to the manufacturing techniques, the submerged process where  
 308 conditions are controlled for a highest yield, promotes a natural selection,  
 309 maintaining the most resistant species, whilst the traditional process (Orleans)  
 310 allows a diversified culture development (Román-Camacho et al., 2020).

311 Liu et al., 2019 have also detected lactic acid contents in 2 Chinese apple  
 312 vinegar samples, although another 12 samples had no detectable values. In  
 313 addition, this study showed a huge diversity and complexity in the composition of  
 314 organic acids present in 23 fruit vinegars.

315 Hereupon, the raw material becomes just one of the factors responsible  
 316 for the final composition of the vinegar. Likewise, the acetic acid content is also  
 317 subject to variation due to these factors, excepting in this case its minimum  
 318 content is established by Brazil law.

319 Thus, all these factors together can explain the acid content variation found  
 320 into the studied vinegar samples, and therefore, it was not possible to establish  
 321 a direct comparison among them and confirm possible frauds based on the  
 322 quantification of these substances only.

323 This result strengthens the requirement for non-targeted spectral  
324 techniques, capable to determinate several chemical compounds simultaneously,  
325 combined with chemometric, as a promissory tool to detect adulterations in  
326 fermented products.

327

#### 328 **4. Conclusion**

329

330 Apple and white vinegar samples were chemically distinguished by  
331 spectroscopic techniques with the help of chemometrics. Among the applied  
332 techniques, <sup>1</sup>H-NMR presented the most promising result as, through the  
333 simultaneous identification of several compounds present in each sample, such  
334 as amino acids, organic acids, esters and alcohols, it established three distinct  
335 profiles and allowed a separation of apple vinegar, white vinegar and adulterated  
336 vinegar.

337 The lactic and acetic acids content analyzed by UPLC confirmed the  
338 qualitative information indicated by NMR, where lactic acid was detected only in  
339 apple vinegars and it was not detected in white vinegars. However, such data  
340 solely were not able to elucidate the adulterated samples. And the UV-vis  
341 analysis, despite indicating a direction to differ both types of vinegar, did not  
342 detect the fraud into this group of samples. As an unspecific technique to  
343 identification compounds, considering that more than one metabolite can absorb  
344 in the same region, it would be necessary future researches resorting a larger  
345 number of samples in order to development a more robust model.

346 By exploring non-targeted fast techniques, with short pre-treatment  
347 sample which deliver a global view of the chemical composition of the product,  
348 this paper opens up advancing path for Brazilian research related to food fraud  
349 and encourages the improvement of these methods thinking on feasibility and  
350 propagation of these techniques to the industry with consequently benefit to  
351 consumers.

352

353

#### 353 **References**

354

355 Ballabio, D., & Consonni, V. (2013). Classification tools in chemistry. Part 1:  
356 Linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*, 5(16), 3790–3798.

- 357 <https://doi.org/10.1039/c3ay40582f>
- 358 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2020). Instrução  
359 Normativa nº 16, de 19 de março de 2020. Estabelece a proibição de  
360 utilização de açúcar na elaboração do fermentado de fruta que sirva de  
361 matéria prima para a produção de fermentado acético de fruta. Diário  
362 Oficial da República Federativa do Brasil.
- 363 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2012a). Instrução  
364 Normativa nº 6, de 3 de abril de 2012. Estabelece os padrões de  
365 identidade e qualidade e a classificação dos fermentados acéticos. Diário  
366 Oficial da República Federativa do Brasil.
- 367 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2012b). Instrução  
368 Normativa nº 34, de 29 de novembro de 2012. Estabelece, na forma desta  
369 Instrução Normativa e das tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 constantes do  
370 seu Anexo I, a complementação dos padrões de identidade e qualidade  
371 para as seguintes bebidas fermentadas: I – fermentado de fruta; II –  
372 fermentado de fruta licoroso; III – fermentado de fruta composto; IV – sidra;  
373 V – hidromel; VI – fermentado de cana e; VII – saquê ou sake. Diário  
374 Oficial da República Federativa do Brasil.
- 375 Ballabio, D., & Consonni, V. (2013). Classification tools in chemistry. Part 1:  
376 Linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*, 5(16), 3790–3798.  
377 <https://doi.org/10.1039/c3ay40582f>
- 378 Callao, M. P., & Ruisánchez, I. (2018). An overview of multivariate qualitative  
379 methods for food fraud detection. *Food Control*, 86, 283–293.  
380 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.034>
- 381 Liu, Q., Tang, G. Y., Zhao, C. N., Gan, R. Y., & Li, H. Bin. (2019). Antioxidant  
382 activities, phenolic profiles, and organic acid contents of fruit vinegars.  
383 *Antioxidants*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antiox8040078>
- 384 McGrath, T. F., Haughey, S. A., Patterson, J., Fauhl-Hassek, C., Donarski, J.,  
385 Alewijn, M., van Ruth, S., & Elliott, C. T. (2018). What are the scientific  
386 challenges in moving from targeted to non-targeted methods for food fraud  
387 testing and how can they be addressed? – Spectroscopy case study. In  
388 *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 76, pp. 38–55). Elsevier Ltd.  
389 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.001>
- 390 Papotti, G., Bertelli, D., Graziosi, R., Maietti, A., Tedeschi, P., Marchetti, A., &

- 391 Plessi, M. (2015). Traditional balsamic vinegar and balsamic vinegar of  
392 Modena analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy coupled  
393 with multivariate data analysis. *LWT - Food Science and Technology*,  
394 *60*(2), 1017–1024. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.042>
- 395 Ríos-Reina, R., Azcarate, S. M., Camiña, J., Callejón, R. M., & Amigo, J. M.  
396 (2019). Application of hierarchical classification models and reliability  
397 estimation by bootstrapping, for authentication and discrimination of wine  
398 vinegars by UV–vis spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory*  
399 *Systems*, *191*, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.06.001>
- 400 Ríos-Reina, R., Camiña, J. M., Callejón, R. M., & Azcarate, S. M. (2021).  
401 Spectralprint techniques for wine and vinegar characterization,  
402 authentication and quality control: Advances and projections. In *TrAC -*  
403 *Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 134). Elsevier B.V.  
404 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116121>
- 405 Spink, J., Ortega, D. L., Chen, C., & Wu, F. (2017). Food fraud prevention shifts  
406 the food risk focus to vulnerability. *Trends in Food Science and*  
407 *Technology*, *62*, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.012>
- 408

## 7.2 INSTRUÇÕES AO AUTOR

Transcrição do conteúdo divulgado pela revista (CAMPBELL-PLATT, G. et al., 2021).

*Food Control* is an international journal that provides essential information for those involved in food safety and process control.

*Food Control* covers:

- Microbial food safety and antimicrobial systems
- Mycotoxins
- Hazard analysis, HACCP and food safety objectives
- Risk assessment, including microbial risk assessment
- Quality assurance and control
- Good manufacturing practices
- Food process systems design and control
- Food Packaging
- Rapid methods of analysis and detection, including sensor technology
- Environmental control and safety
- Codes of practice, legislation and international harmonization
- Consumer issues
- Education, training and research needs.

The scope of *Food Control* is comprehensive and includes original research papers, authoritative reviews, short communications, comment articles that report on new developments in food control, and position papers.

The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions that do not fulfil these requirements will not be considered for review and publication.

### **Types of paper**

- Original high-quality research papers (preferably no more than 7000 words, including tables and illustrations).
- Major review articles, up to 10,000 words
- Short communications of up to 3000 words (not including references), describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.
- Short reviews on topical subjects, up to 6000 words.
- Comment articles not exceeding 2000 words.
- Authoritative position papers from expert groups are also welcome.

*Food Control* also publishes book reviews, Letters to the Editor, conference reports and a calendar of forthcoming events.

The Editor-in-Chief has the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) of insufficient novelty for a wide international readership; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

All contributions deemed suitable for review are read by two or more referees to ensure both accuracy and relevance, and revisions to the script may thus be required. On acceptance, contributions are subject to editorial amendment to suit house style. When a manuscript is returned for revision prior to final acceptance, the revised version must be submitted as soon as possible after the author's receipt of the referees' reports. Revised manuscripts returned after four months will be considered as new submissions subject to full re-review.

### Contact details for submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal <https://www.editorialmanager.com/foodcont/default.aspx> you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files.

### Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

### Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

### Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file

(if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

### Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

### Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers

the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

## Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

## Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

## Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

## Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

## Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

## Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

## Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

## Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used

in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in Editorial Manager, or a department.

### **Referees**

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

### **Peer review**

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

### **Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

**Request you to kindly submit your manuscript with continuous line numbers.**

### **Article structure**

#### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### ***Materials and Methods***

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

## Key Resources Table

To enable reproducibility of the research, we encourage authors to submit a Key Resources Table, which helps make the resources clear to readers. The Key Resources Table highlights the genetically modified organisms and strains, cell lines, reagents and other resources essential to reproduce the results presented in a paper. More information is available here <https://www.elsevier.com/authors/author-resources/key-resources-table>

### **Theory/calculation**

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### **Results**

Results should be clear and concise.

### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### **Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Appendices**

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Formatting of funding sources**

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### **Math formulae**

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### ***Mathematical and technical settings***

Use the appropriate number of significant figures to express your data - they should be justifiable and reflect the necessary level of accuracy of the method. A normal maximum should be 3 - e.g. 37.1, 2.53). Detailed mathematical discussion should be placed in an appendix. Equations and formulae should be typewritten. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page. Special symbols should be identified in the margin, and the meaning of all symbols should be explained in the text where they first occur. If you use several symbols, a list of definitions (not necessarily for publication) will help the editor. Type mathematical equations exactly as they should appear in print. Journal style for letter symbols is as follows: italic (indicated by underlining); constants, roman type; matrices and vectors, bold type (indicated by wavy underlining).

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### ***Electronic artwork***

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

##### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

##### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### ***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures

will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### ***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### **References**

#### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### ***References in a special issue***

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### ***Reference management software***

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to](#)

### [remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-control>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### **Reference style**

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-3215-4, copies of which may be [ordered online](#).

*List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, Article e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style* (4th ed.). Longman (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Powertech Systems. (2015). *Lithium-ion vs lead-acid cost analysis*. Retrieved from <http://www.powertechsystems.eu/home/tech-corner/lithium-ion-vs-lead-acid-cost-analysis/>. Accessed January 6, 2016

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., & Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1.  
<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). *The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales*. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S. (2020, March 25). *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

### **Journal abbreviations source**

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or

animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### ***Data linking***

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

**Mendeley Data**

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

**Data statement**

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

## REFERÊNCIAS

ATIK, D.; ATIK, C.; KARATEPE, C. The effect of external apple vinegar application on varicosity symptoms, pain, and social appearance anxiety: a randomized controlled trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2016, 2016.

BAKIR, S. et al. Investigating the antioxidant and antimicrobial activities of different vinegars. **European Food Research and Technology**. v. 243, p. 2083-2094, 2017.

BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: Linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**. v. 5, p. 3790-3798, 2013.

BRERETON, R.G. Applied Chemometrics for Scientists. **John Wiley & Sons Ltd**. p. 132, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2020. Instrução Normativa nº 16, de 19 de março de 2020. Estabelece a proibição de utilização de açúcar na elaboração do fermentado de fruta que sirva de matéria prima para a produção de fermentado acético de fruta. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n.56, 23 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagre**. 2016. Disponível em: < [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/arquivos-metodos-da-area-bev-iqa?b\\_start:int=140](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/arquivos-metodos-da-area-bev-iqa?b_start:int=140) >. Acesso em 28 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012a. Instrução Normativa nº 6, de 3 de abril de 2012. Estabelece os padrões de identidade e qualidade e a classificação dos fermentados acéticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, 4 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012b. Instrução Normativa nº 34, de 29 de novembro de 2012. Estabelece, na forma desta Instrução Normativa e das tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 constantes do seu Anexo I, a complementação dos padrões de identidade e qualidade para as seguintes bebidas fermentadas: I – fermentado de fruta; II – fermentado de fruta licoroso; III – fermentado de fruta composto; IV – sidra; V – hidromel; VI – fermentado de cana e; VII – saquê ou sake. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, 30 nov. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2001. Instrução Normativa nº 4, de 5 de fevereiro de 2001. **Aprova a metodologia de análise da razão isotópica que especifica em produtos e subprodutos das plantas do ciclo fotossintético que menciona**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-4-de-5-de-fevereiro-de-2001.pdf/view>> Acesso em 02 jul. 2020.

CALLAO, M. P.; RUISÁNCHEZ, I. An overview of multivariate qualitative methods for food fraud detection. **Food Control**. v. 86, p. 283-293, 2018.

CAMPBELL-PLATT, G. et al. (Ed.). **Author information pack**. Food Control. 2021. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/journals/food-control/0956-7135/guide-for-authors>>. Acesso em 29 mai.2021.

CHEN, H. et al. Vinegar functions on health: constituents, sources, and formation mechanisms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 15, p.1124-1138, 2016.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L.R. The potentiality of NMR-based metabolomics in food science and food authentication assessment. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v. 57, p. 558-578, 2019.

CONSONNI, R. et al. Analytical method for authentication of Traditional Balsamic Vinegar of Modena. **Talanta**. v. 75, p. 765-769, 2008.

DABIJA, A.; HATNEAN, C. A. Study concerning the quality of apple vinegar obtained through classical method. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**. v. 20(4), p. 304-310, 2014.

DU, G. et al. Phenolic composition of apple products and by-products based on cold pressing technology. **Journal of Food Science and Technology**. v. 56(3), p. 1389-1397, 2019.

EHMKE, M. D. et al. Food fraud: economic insights into the dark side of incentives. **Australian Journal of Agricultural and Resource Economics**. v. 63, p. 685-700, 2019.

ELLIOTT, C. **Elliott review into the integrity and assurance of food supply networks – Final report**. 2014. Disponível em:

<[https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/350726/elliott-review-final-report-july2014.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/350726/elliott-review-final-report-july2014.pdf)>. Acesso em 10 abr. 2020

FANALI, C. et al. Recent developments in High-Performance Liquid Chromatography. In: NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. (Ed.). **Food Analysis by HPLC**. Third edition. Flórida: CRC Press, 2013. p. 1-32.

FAO. **It's time for fixed definitions for food fraud and food integrity**. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/news-and-events/news-details/en/c/897028/>>. Acesso em: 07 fev. 2020.

FERREIRA, M.M.C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Sociedade Brasileira de Química**. v. 13, p. 742-753, 2002.

FORC. **A oportunidade faz a fraude**. 2019. Disponível em: <<https://alimentossemmitos.com.br/a-oportunidade-faz-a-fraude>>. Acesso em: 10 abr. 2020.

GFSI. **Tacking Food Fraud Through Food Safety Management Systems**. 2018. Disponível em: <<https://mygfsi.com/wp-content/uploads/2019/09/Food-Fraud-GFSI-Technical-Document.pdf>>. Acesso em: 08 fev 2020.

HALIMA, B. H. et al. Apple cider vinegar attenuates oxidative stress and reduces the risk of obesity in high-fat-fed male wistar rats. **Journal of Medicinal Food**. v. 00 (0), p. 1–11, 2017.

HO, C. W. et al. The biochemistry of vinegar production. In: BEKATOROU, A. (Ed.). **Advances in Vinegar Production**. Flórida: CRC Press, 2019. p. 29-36.

HO, C. W. et al. Varieties, production, composition and health benefits of vinegar: a review. **Food Chemistry**. v. 221, p. 1621-1630, 2017.

HONG, E. et al. Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 97, p.3877–389, 2017.

HORNEDO-ORTEGA, R. et al. Influence of fermentation process on the anthocyanin composition of wine and vinegar elaborated from strawberry. **Journal of Food Science**. v. 82, n. 2, p. 364-372, 2017.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. 1 ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

JOSHI, V.K; SHARMA, Somesh. Cider vinegar: Microbiology, Technology and Quality. In: SOLIERI, L; GIUDICI, P. **Vinegars of the World**. Itália: Springer, 2009. p. 197-206.

KALINOWSKA, M. et al. Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 84, p. 169-188, 2014.

KAUSAR, S. et al. Effect of apple cider vinegar on glycemic control, hyperlipidemia and control on body weight in type 2 diabetes patients. **International Journal of Medical Research & Health Sciences**. v. 8(5), p. 59-74, 2019.

KHEZRI, S. S. et al. Beneficial effects of apple cider vinegar on weight management, visceral adiposity index and lipid profile in overweight or obese subjects receiving restricted calorie diet: a randomized clinical trial. **Journal of Functional Foods**. v. 43, p. 95-102, 2018.

KUBALLA, T. et al. Application of NMR for authentication of honey, beer and spices. **Current Opinion in Food Science**. v. 19, p. 57-62, 2018.

LIM, S. J. et al. History and current issues of vinegar. In: BEKATOROU, A. (Ed.). **Advances in Vinegar Production**. Flórida: CRC Press, 2019. p. 1-19.

LIMA, J. **Laboratório móvel analisa amostras de azeite de oliva para verificar se há fraude nos produtos**. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/laboratorio-movel-analisa-amostras-de-azeite-de-oliva-para-verificar-se-ha-fraude-nos-produtos>>. Acesso em 10 abr. 2020.

LINEAR COMUNICAÇÃO. Operação carne fraca: relatório analítico de repercussão em mídia. 2017. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/operacao-carne-fraca.pdf/view>>. Acesso em: 13 abr. 2020.

LIU, Q. et al. Antioxidant activities, phenolic profiles, and organic acid contents of fruit vinegars. **Antioxidants**. v. 8, n. 78, 2019.

LONCARIC, A. et al. Peel of traditional apple varieties as a great source of bioactive compounds: extraction by micro-matrix solid-phase dispersion. **Foods**. v. 9, n. 80, 2020.

LUZÓN-QUINTANA, L. M.; CASTRO, R.; DURÁN-GUERRERRO, E. Biotechnological processes in fruit vinegar production. **Foods**, v.10, n.5, 2021.

MAINARDI, L. F. **Os desafios para o setor lácteo gaúcho**. 2013. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/os-desafios-para-o-setor-lacteo-gaúcho>>. Acesso em 10 abr. 2020.

MAZZA, S; MUROOKA, Y. Vinegars Through the Ages. In: SOLIERI, L; GIUDICI, P. **Vinegars of the World**. Itália: Springer, 2009. p. 17-39.

MCGRATH, T. F. et al. What are the scientific challenges in moving from targeted to non-targeted methods for food fraud testing and how can they be

addressed? – Spectroscopy case study. **Trends in Food Science & Technology**. v. 76, p. 38-55, 2018.

MIHAILOVIC, N. R. et al. Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 67, p. 1-9, 2018.

NIE, J. et al. Comparison of two types of vinegar with different aging times by NMR-based metabolomic approach. **Journal of Food Biochemistry**. v. 43:e12835, 2019.

PALMA, M. S. A.; CARVALHO, L. F. C. P.; GAVÓGLIO, L. C. Vinagres. In: AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 183-208.

PAPOTTI, G. et al. Traditional balsamic vinegar and balsamic vinegar of Modena analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy coupled with multivariate data analysis. **LWT - Food Science and Technology**. v. 60 p. 1017-1024, 2015.

PERSISTENCE MARKET RESEARCH. **Dressing vinegar and condiments market**. 2017. Disponível em: < Global Market Study on Dressing Vinegar & Condiments: Apple Cider Vinegar and Red Wine Vinegar Segments Projected to Gain High BPS Shares During 2016 - 2024 (persistencemarketresearch.com)>. Acesso em: 10 março 2021.

QIU, X.; ZHANG, Y.; HONG, H. Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism. **AMB Express** v.11, 2021.

REN, M. et al. Characterization of organic acids and phenolic compounds of cereal vinegars and fruit vinegars in china. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 41: e12937, 2017.

RÍOS-REINA, R. et al. Application of hierarchical classification models and reliability estimation by bootstrapping, for authentication and discrimination of wine vinegars by UV-vis spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 191, p. 42-53, 2019.

RÍOS-REINA, R. et al. Spectralprint techniques for wine and vinegar characterization, authentication and quality control: Advances and projections. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 134, 2021.

RIZZON, L. A. **Sistema de produção de vinagre**. 2006. Disponível em:< <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/legislacao.htm>>. Acesso em: 02 abril 2020.

ROMÁN-CAMACHO, J. J. et al. Metaproteomics of microbiota involved in submerged culture production of alcohol wine vinegar: A first approach. **International Journal of Food Microbiology**. v. 33, 2020,

SAQIB, A. Molecular docking studies of acetic acid in apple cider vinegar for antidiabetic activity. **International Journal of Engineering & Scientific Research**. v. 6, 2018.

SOBOLEV, A. P. et al. Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. **Trends in Food Science & Technology**. v. 91, p. 347-353, 2019.

SPINK, J. et al. Food fraud prevention shifts the food risk focus to vulnerability. **Trends in Food Science & Technology**. v. 43, 2017.

TORRECILLA, J. S. et al. Algorithmic modeling of spectroscopic data to quantify binary mixtures of vinegars of different botanical origins. **Analytical Methods**. v. 8, p. 2786-2793, 2016a.

TORRECILLA, J. S. et al. Linear and non-linear modeling to identify vinegars in blend through spectroscopic data. **LWT – Food Science and Technology**. v. 65, p. 565-571, 2016b.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia 12. edição**. Tradução de DAIAN, D. S. O.; DORVILLÉ, L. F. M. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2017. 935 p. Tradução de: Microbiology: an introduction, 12th edition.

UNIÃO EUROPEIA. **Regulation (EU) No 1151/2012 of the European Parliament and of the Council of 21 November 2012 on quality schemes for agricultural products and foodstuffs**. 2012. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32012R1151>>. Acesso em: 26 mar 2020.

VAN RUTH, S. M. et al. Food fraud vulnerability and its key factors. **Trends in Food Science & Technology**. v. 67, p. 70-75, 2017.

XIA, T. et al. Nutrients and bioactive components from vinegar: a fermented and functional food. **Journal of Functional Foods**. v. 64, 2020.

YAGNIK, D; SERAFIN, V; SHAH, Ajit J. Antimicrobial activity of apple cider vinegar against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*; downregulating cytokine and microbial protein expression. **Scientific Reports**. v. 8:1732, 2018.

## APÊNDICE

### Apêndice 1 – TCLE Pesquisa de Campo

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar da pesquisa “Detecção de fraude em vinagres de maçã: análises instrumentais versus teste sensorial de diferença”, sob orientação da Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa, a ser realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina/UEL. A pesquisa faz-se necessária em decorrência de eventos de fraude constatadas em alimentos, porém pouco estudadas no vinagre. Tal pesquisa tem o intuito de levantar informações referentes ao: (1) consumo e principais características do consumidor de vinagre no Brasil; (2) o conhecimento do consumidor em relação à qualidade e fraude nos vinagres comercializados no Brasil.

Convido-o a participar desta pesquisa e informo que sua participação envolve responder um questionário estruturado acerca dos temas supracitados. A participação nesse estudo é voluntária e se você decidir não participar ou quiser desistir de continuar em qualquer momento, tem absoluta liberdade de fazê-lo.

No que se refere à coleta de dados, o início previsto ocorrerá no dia 01/09/2020 e o término até o dia 30/10/2020. Você recebeu o questionário através das redes sociais de maior alcance *LinkedIn*, *Instagram*, *Facebook* e *WhatsApp*. Após ter acesso ao link referente à pesquisa, você irá responder o questionário on-line por meio da plataforma ‘Google formulários’ que foi elaborado de forma clara e didática, contendo 14 perguntas de múltipla escolha com duração média de 3 minutos. Os temas abordados serão: (1) indicadores socioeconômicos (2) consumo de vinagre (3) conhecimento em relação à qualidade e fraude em vinagres. No que tange aos incômodos e possíveis riscos à sua saúde física e/ou mental que podem ocorrer, caso alguma questão o incomode, ao menor desconforto, de qualquer ordem, informamos que sua participação poderá ser interrompida ou até mesmo cancelada.

Os resultados desta pesquisa serão utilizados somente para a produção de trabalhos científicos, apresentações em eventos e publicações em revista científica nacional e/ou internacional, não os fornecendo, total ou parcialmente, para quaisquer outros fins, que não sejam de cunho acadêmico. O questionário não contém campo para preenchimento de nome e/ou identificação, sendo sua participação inteiramente anônima. Mesmo não tendo benefícios diretos em participar, indiretamente você contribuirá para a compreensão do fenômeno estudado e para a produção e disseminação de conhecimento científico. Caso o

respondente sinta desconforto, além do tolerável, poderá contar com a assistência psicológica, sendo responsável pelo encaminhamento a pesquisadora e pelo atendimento os profissionais da clínica de psicologia da UEL.

Adicionalmente, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo, bem como a qualquer momento, você poderá recusar a continuar participando do estudo e, também, poderá retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo. Este estudo não acarretará nenhuma despesa para você. Caso ocorra algum dano, decorrente de sua participação na pesquisa, as pesquisadoras se responsabilizam pelo atendimento e orientação.

Quaisquer dúvidas relativas à pesquisa poderão ser por mim esclarecidas, pelo e-mail [nigep.alimentos@gmail.com](mailto:nigep.alimentos@gmail.com)



Londrina, 05 de agosto de 2020

---

Pesquisadora responsável  
Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa

Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO. Assim, ao aceitar participar assinale a opção 'sim' e você será direcionado ao questionário, caso recuse, assinale a opção "não" e a pesquisa se encerrará.

Você concorda em participar desta pesquisa? ( ) sim ( ) não

Dados para contato:

CEP-UEL (Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - CEP/UEL:

LABESC - Laboratório Escola de Pós-Graduação - sala 14, Campus Universitário  
Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380 (PR 445)

Londrina- PR - CEP: 86057-970

Telefone: 43-3371-5455

E-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br)

Contato da pesquisadora responsável:

Wilma Aparecida Spinosa - RG: 11.692.263 / CPF: 050.268.458-51

Endereço: R. Ernâni Lacerda de Athayde, 1035

Londrina-PR CEP: 86055-630

Telefones: (43) 3371-4585

E-mail: [wilma.spinosa@uel.br](mailto:wilma.spinosa@uel.br)

Londrina, 05 de agosto de 2020.