

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Joana Sofia Gomes Dias

**Avaliação de processos alternativos de
inativação de leveduras de decomposição
do vinho**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do

Doutor Ricardo Nuno Correia Pereira

**Professor Doutor António Augusto Martins de
Oliveira Soares Vicente**

**Engenheiro Guilherme Paulo Dias de Castro
Pereira**

outubro de 2018

Autor:

Joana Sofia Gomes Dias

Título da dissertação:

Avaliação de processos alternativos de inativação de leveduras de decomposição do vinho

Orientadores:

Doutor Ricardo Nuno Correia Pereira

Professor Doutor António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente

Engenheiro Guilherme Paulo Dias de Castro Pereira

Ano de conclusão:

2018

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo Tecnologia Química e Alimentar

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO

Universidade do Minho, 30/10/2018

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação não teria sido possível sem o apoio, incentivo e orientação de algumas pessoas, a quem deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

Ao Doutor Ricardo Pereira, pela sua disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas, orientação do trabalho prático e acompanhamento durante todo o projeto.

Ao Professor António Vicente, pela sua orientação e por todos os conhecimentos transmitidos, não só nos últimos meses mas nos cinco anos deste curso. Agradeço, igualmente, a oportunidade de realizar o estágio no Laboratório de Indústria e Processo e as ótimas condições criadas.

Ao Engenheiro Guilherme Pereira, pela sua disponibilidade e por todos os conhecimentos práticos transmitidos.

A todos os membros do LIP pela ajuda, paciência e disponibilidade ao longo deste projeto e pela forma como me acolheram, em especial ao Jean-Michel por todo o acompanhamento na realização do trabalho.

Ao Bruno, pela paciência, apoio, ajuda, companheirismo, compreensão e por toda a força transmitida no decorrer da elaboração desta tese.

Aos meus amigos por todo o incentivo e carinho demonstrado, em especial à Cláudia por toda a sua preciosa ajuda nos últimos cinco anos e por todos os bons momentos de distração e ao Ricardo pela partilha de bancada nos últimos meses e todas as conversas motivacionais.

Aos meus pais, avós e irmã por me terem facultado todas as condições necessárias para terminar esta etapa e pelo apoio incondicional.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar a influência da aplicação da tecnologia de aquecimento óhmico e consequente aplicação de campos elétricos moderados na inativação dos microrganismos nativos do mosto de Vinho Verde branco. Foi igualmente avaliada a viabilidade industrial da substituição do dióxido de enxofre pela aplicação da tecnologia de aquecimento óhmico como método de preservação.

Assim, o trabalho foi dividido em três etapas principais: i) caracterização das propriedades físico-químicas do mosto e identificação da sua microflora nativa; ii) análise da influência dos tratamentos aplicados; e iii) avaliação da viabilidade de implementação da tecnologia em ambiente industrial.

Constatou-se a existência de uma elevada variabilidade entre os diferentes lotes de mosto usados experimentalmente, quer no aspeto visual quer na sua caracterização físico-química e microbiológica, sendo que os microrganismos mais frequentes correspondem às espécies de leveduras *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens* e *Pichia anomala*

Quanto aos tratamentos, foi comprovado que o mosto é passível de ser aquecido por aplicação de campos elétricos moderados. Com estes, é possível obter a mesma taxa de inativação observada nos binómios de pasteurização convencional, mas num intervalo de tempo muito inferior. No entanto, não foi possível concluir se a aplicação de campos apresenta ou não um efeito não-térmico adicional na inativação dos microrganismos.

Em culturas puras da estirpe *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801 verificou-se que os tratamentos óhmicos a 90 °C por 1 s permitem a redução de 5 ciclos logarítmicos da concentração de leveduras, sendo espectável que os mostos tratados mantenham a sua estabilidade por um período mínimo de 21 dias, mesmo quando mantidos sem refrigeração.

Os tratamentos de aquecimento não originam alterações indesejadas nos parâmetros intrínsecos das amostras, não sendo espectável que afetem o vinho delas resultante.

De um modo geral, o aquecimento óhmico apresenta-se como uma alternativa válida à adição de compostos químicos, permitindo manter a estabilidade microbiológica dos mostos por longos períodos de tempo, através de tratamentos rápidos e simples de operar.

Palavras-chave: Vinho Verde, Mosto, Inativação, Aquecimento Óhmico, Campos Elétricos

ABSTRACT

The main objective of this work was to evaluate the influence of Ohmic Heating and resulting Moderate Electric Fields on the inactivation of the native population of microorganisms in white “Vinho Verde”. Also, the viability of the substitution of sulphur dioxide for ohmic heating as a preservation method in industrial scale was assessed.

Thus, the work was divided in three main tasks: i) physical and chemical characterization of the must and identification of its native microflora; ii) analysis of the effect of the treatments; and iii) evaluation of the viability of the technology’s implementation in industrial scale.

It was observed that the different samples used had a high variability, either on their appearance and/or in their characteristics. The most common yeasts found corresponded to the descriptions of *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens* and *Pichia anomala*.

With the treatments it was proven that the must can be heated by the application of moderate electrical fields. Using the technology, it is possible to obtain the same inactivation rate as in conventional pasteurization but in an inferior time frame. However, it was not possible to observe if the application of electrical fields creates an additional nonthermal effect in the inactivation of microorganisms.

In pure cultures of the strain *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801 it was verified that ohmic treatments of 90 °C during 1 s reduce the yeast concentration up to 5 logarithmic cycles. The treated musts are expected to maintain their stability for a minimum of 21 days even when stored without refrigeration.

Generally, the ohmic heating treatments do not result in unwanted changes in the samples’ parameters, so it is not expectable that they will affect the wine produced from them.

Overall, ohmic heating has proven to be a viable alternative to the addition of chemical compounds, allowing to maintain the stability of wine must for long periods of time, through simple and short procedures.

Keywords: Vinho Verde, Must, Inactivation, Ohmic Heating, Electric Fields

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1 Motivação e objetivos	1
1.2 Organização da dissertação	2
2. Fundamentação Teórica.....	3
2.1 A indústria dos Vinhos Verdes	3
2.1.1 As particularidades da região dos Vinhos Verdes	5
2.1.2 O processo de produção do Vinho Verde branco	10
2.1.3 Segurança Alimentar.....	14
2.1.4 Impactes Ambientais.....	16
2.2 Microflora natural do mosto e a sua influência no vinho.....	16
2.2.1 Fatores que afetam a cinética do crescimento microbiano	18
2.2.2 Microrganismos de degradação	21
2.3 Métodos de conservação do mosto e vinho.....	24
2.3.1 O dióxido de enxofre	24
2.3.2 Métodos alternativos.....	26
2.3.3 Aquecimento Óhmico	29
3. Metodologias	35
3.1 Caraterização física e química do mosto.....	35
3.2 Microbiologia.....	36
3.3 Aquecimento Óhmico	40
4. Resultados e discussão	45
4.1 Caraterização física e química do mosto.....	45
4.2 Caraterização microbiológica do mosto.....	46

4.3	Aptidão do mosto para a aplicação da tecnologia	53
4.4	Ensaio exploratório de inativação	55
4.4.1	Inativação por binómios de pasteurização.....	56
4.4.2	Ensaio de inativação em condições moderadas de temperatura.....	60
4.4.3	Efeito dos ensaios de inativação nas características físico-químicas do mosto	66
4.5	Ensaio de inativação com a levedura PYCC 4801	69
4.6	Avaliação da viabilidade de implementação da tecnologia em escala industrial	76
4.6.1	Cálculo da energia gasta durante o tratamento	76
4.6.2	Possibilidades de implementação da tecnologia.....	77
4.6.3	Estudo de mercado	78
5.	Conclusões e Recomendações futuras	81
5.1	Principais conclusões do trabalho prático	81
5.2	Perspetivas para desenvolvimentos futuros	83
	Bibliografia	85
	Anexo I – Composição do Meio WL.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Logótipo da OIV	3
Figura 2. Sub-regiões da região dos Vinhos Verdes.....	5
Figura 3. Esquema das folhas e bagos das principais castas de Vinho Verde branco. .	7
Figura 4. Pictogramas para menção dos alergénios presentes no vinho.	9
Figura 5. Selo de garantia para Vinhos Verdes.....	9
Figura 6. Esquema das principais etapas da produção de vinho.	11
Figura 7. Variação das espécies de (A) leveduras não <i>Saccharomyces</i> , (B) <i>Saccharomyces</i> , (C) <i>Oenococcus oeni</i> , e (D) leveduras e/ou bactérias de degradação durante a produção de vinho.	17
Figura 8. Esquema dos componentes.	29
Figura 9. Matraz usado para monitorização do crescimento ao longo do tempo.....	38
Figura 10. Câmara de Neubauer para contagem celular.	38
Figura 11. Esquema dos quadrados usados para contagem de células.....	39
Figura 12. Frascos de criopreservação usados para a manutenção da levedura.....	40
Figura 13. Esquema da instalação experimental.	41
Figura 14. Avaliação visual da variabilidade das amostras de mosto.	45
Figura 15. Amostra de mosto em meio WL (A) e WL seletivo (B).	47
Figura 16. Fotografia de algumas das diferentes espécies nativas do mosto.	48
Figura 17. Placa WL com presença de colónias punctiformes.....	50
Figura 18. Cultura pura de PYCC 4801 em meio WL.	50
Figura 19. Curvas de crescimento médias de cada tipo de mosto.....	52
Figura 20. Perfis de aquecimento do mosto, consoante o campo elétrico aplicado...	54
Figura 21. Perfis de condutividade das soluções salinas e mosto, aquecidos entre 30 °C e 90 °C.....	55
Figura 22. Amostra de mosto não tratado (A e C) e amostra de mosto aquecido a 90 °C (B e D), após o tratamento (fila superior) e 28 dias em refrigeração (fila inferior).	57
Figura 23. Perfis de aquecimento médios para os binómios de pasteurização.	58
Figura 24. Placas representativas dos ensaios a 50 °C, na ausência (A) e presença de campo elétrico (B).	62
Figura 25. Placas representativas dos ensaios de pulso a 40 °C (A) e 50 °C (B).....	63
Figura 26. Perfis de aquecimento médios para os ensaios a 65 °C.	65

Figura 27. Amostra de controlo em diluição 1:1 000 (A) e amostras aquecidas a 90 °C, por diluir, dos tratamentos na ausência (B) e presença (C) de campo elétrico.	70
Figura 28. Amostras aquecidas a 45 °C, em diluição 1:10, dos tratamentos na ausência (A) e presença (B) de campo elétrico.	71
Figura 29. Perfis de aquecimento médios correspondentes às três formas de operação.	72
Figura 30. Estabilidade dos tratamentos ao longo do tempo, com base na sua concentração celular.....	74
Figura 31. Amostra de controlo, em diluição 1: 10 000 000 (A) e de tratamento em pulso (B), por diluir.....	74
Figura 32. Avaliação do crescimento microbiano a olho nu.	75
Figura 33. Variação da potência ao longo do tratamento.	77
Figura 34. Reator óhmico à escala piloto.....	78
Figura 35. Rótulo do vinho Carm SO ₂ Free Tinto, colheita de 2011.	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais características das castas dominantes na região dos Vinhos Verdes	6
Tabela 2. Classificação das leveduras mais relevantes na indústria dos vinhos, consoante o efeito Crabtree.....	20
Tabela 3. Descrição das colónias no meio WL	23
Tabela 4. Valores da cinética de morte térmica para alguns dos microrganismos de degradação do vinho	27
Tabela 5. Condições operacionais mais relevantes dos ensaios de inativação.....	43
Tabela 6. Valores médios de <i>AR</i> , <i>AT</i> , pH, <i>SST</i> e <i>TP</i> para três lotes de mosto	46
Tabela 7. Percentagens relativas das amostras identificadas no mosto não tratado...	49
Tabela 8. Parâmetros associados ao crescimento microbiológico, obtidos por ajuste dos dados experimentais.....	51
Tabela 9. Valores de condutividade das soluções de cloreto de sódio em função da concentração e comparação com amostras de mosto.....	53
Tabela 10. Condições de operação para os tratamentos em binómio de pasteurização	57
Tabela 11. Efeitos do campo elétrico na inativação a 28 °C	60
Tabela 12. Efeitos da frequência e da duração do tratamento na inativação a 28 °C.	61
Tabela 13. Efeitos da inativação a 40 °C e 50 °C	62
Tabela 14. Condições de operação para os tratamentos moderados	64
Tabela 15. Percentagens de inativação médias dos tratamentos moderados de maior interesse	66
Tabela 16. Efeito dos vários tratamentos na composição do mosto.....	68
Tabela 17. Condições operacionais e contagens em placa dos tratamentos com a levedura PYCC 4801	70
Tabela 18. Resultados de inativação dos ensaios a 90 °C, em três modos de operação distintos.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

<i>A</i>	Área dos elétrodos
ALP	Fosfatase alcalina
AR	Concentração de Açúcares Redutores
AT	Acidez Titulável
ATP	Adenosina Trifosfato
B-Gal	β -galactosidase
\bar{c}	Média das contagens celulares em 5 quadrados
CE	Campo elétrico aplicado
CM	Concentração de microrganismos
CO ₂	Dióxido de carbono
CVRVV	Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes
<i>d</i>	Distância entre os elétrodos
<i>D</i>	Tempo de redução decimal
DCP	Declaração de Colheita e Produção
DMDC	Dimetildicarbonato
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO	Denominação de Origem
<i>E</i>	Energia
<i>f</i>	Fator de diluição
GPL	Gás de Petróleo Liquefeito
HACCP	Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos
HSO ₃ ⁻	Ião bissulfito
HVED	Descargas Elétricas de Alta Voltagem
<i>I</i>	Intensidade da corrente
LOX	Lipoxigenase
MEF	Campos Elétricos Moderados
MRS	De Man, Rogosa e Sharpe
<i>n</i>	Número de colónias presentes em cada placa
<i>N</i> ₀	Tamanho da população no instante inicial
NaCl	Cloreto de sódio
NH ₄ ⁺	Ião amónio
<i>N</i> _{max}	Concentração máxima de microrganismos

NO _x	Óxidos de azoto
N_t	Tamanho da população no instante t
OH	Aquecimento Óhmico
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho
P	Potência
PEC	Pectinase
PEF	Campos Elétricos Pulsados
POH	Aquecimento Óhmico Pulsado
PPO	Polifenoloxidase
PYCC	Portuguese Yeast Culture Collection
RCV	Registo Central Vitícola
SO ₂	Dióxido de enxofre
SO ₃ ²⁻	Ião sulfito
SO _x	Óxidos de enxofre
SST	Sólidos Solúveis Totais
t	Tempo
T	Temperatura
TP	Teor Proteico
UFC	Unidades Formadoras de Colónia
V	Tensão da corrente
Vol	Volume de amostra plaqueado
VBNC	Viável mas não culturável
V_{NaOH}	Volume de titulante
WL	Wallerstein Laboratory Nutrient
YPD	Yeast Peptone Dextrose
μ_{max}	Taxa específica máxima de crescimento
λ	Tempo de latência

1. INTRODUÇÃO

1.1 Motivação e objetivos

O Vinho Verde é um produto com importância nos mercados nacionais e que cada vez mais desperta interesse nos consumidores além-fronteiras. Os dados da Comissão Reguladora revelam que o volume de vinho verde dedicado à exportação mais do que duplicou nos últimos vinte anos, nunca se tendo verificado uma inversão na tendência de crescimento desse mercado.

O processo de produção para a obtenção do Vinho Verde está dividido em duas etapas principais: a viticultura e a vinificação, na qual ocorrem as transformações físico-químicas que dão origem ao vinho.

Infelizmente, a etapa de viticultura mais relevante, a vindima, é sazonal, com o seu pico no final do verão e início do outono, altura em que as uvas apresentam o estado de maturação desejado. Por esse motivo, o início da etapa de vinificação (mais concretamente a produção de mosto) estará concentrada nessa época, ao contrário da procura do mercado, que decorre durante todo o ano. Desse desequilíbrio, associado ao facto de o Vinho Verde perder alguns aromas frutados e florais característicos se armazenado por longos períodos, surge a necessidade de recorrer a métodos de conservação que permitam o armazenamento do mosto por períodos alargados de tempo, levando a uma vinificação melhor distribuída ao longo do ano.

Para conservar o mosto até ser fermentado a metodologia mais frequente baseia-se na adição de dióxido de enxofre. Este composto tem eficácia comprovada como antioxidante e antimicrobiano, mas é igualmente considerado como tóxico e alergénico (razão pela qual o limite máximo nos vinhos brancos é de 200 mg L^{-1}), sendo necessário efetuar a sua remoção antes da etapa fermentativa e mencionar a sua presença no rótulo do produto sempre que a sua concentração ultrapassar os 10 mg L^{-1} .

Devido ao aumento da procura por parte dos consumidores de produtos mais naturais e com menor adição de químicos, bem como os custos associados à adição e remoção de dióxido de enxofre, surge o interesse em usar tecnologias de estabilização alternativas, de entre as quais se destacam a aplicação de campos elétricos.

Tendo em conta este contexto, o desafio apresentado consistiu na aplicação de novas alternativas de processamento baseadas na aplicação de campos elétricos moderados, em escala laboratorial, na linha de produção do "Vinho Verde", relacionando a eficácia de inativação dos microrganismos indesejados com parâmetros de operação cruciais, tais como a frequência elétrica, campo elétrico aplicado e temperatura. Os objetivos deste estudo consistem em i) caracterização das propriedades físico-químicas do mosto e identificação da sua microflora nativa, ii) análise da influência dos tratamentos aplicados na microflora nativa e em estirpe de levedura artificialmente inoculada e iii) avaliação da viabilidade de implementação da tecnologia. Para cumprir os objetivos, foi utilizada a estirpe *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801 por se tratar de uma das leveduras mais perigosas na produção de vinho, originando graves defeitos organoléticos.

1.2 Organização da dissertação

O documento está dividido em cinco secções principais, correspondendo a cinco capítulos.

No primeiro capítulo é feita a apresentação do desafio proposto e a sua relevância.

No segundo capítulo, correspondente à secção mais teórica da dissertação, é feita uma abordagem ao estado de arte dos três principais temas: o processo de produção de vinho, os microrganismos que afetam esse processo e as técnicas para o seu controlo.

No terceiro capítulo é descrita a metodologia utilizada em laboratório de forma a realizar todos os ensaios que permitiram responder ao desafio proposto.

É no quarto capítulo que são apresentados os principais resultados obtidos durante o estágio e é feita a sua análise.

Por último, no quinto capítulo, é feito um resumo das principais conclusões bem como recomendações para trabalhos futuros.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A indústria dos Vinhos Verdes

Desde os primórdios da civilização que o ser humano se dedicou à domesticação e cultura de espécies vegetais, entre elas a videira. Associada a essa prática veio a produção de vinho, com registos de existência do produto em 5000 a.c. na região do “Crescente Fértil”. Passado vários séculos, é sob a influência dos Romanos que o vinho é difundido na região do Mediterrâneo e, durante o primeiro século, são cultivadas em larga escala diferentes variedades de videiras. Mesmo depois da queda do império romano, a tradição de consumo e interesse pelo produto não se perdeu (Horsey, 2007).

No século XVII, com a expansão dos descobrimentos, Portugal torna-se uma zona vitivinícola de referência, devido ao prestígio dos seus vinhos e volume de exportações, que sofreram um incremento exponencial em 1703 com a assinatura do Tratado Comercial de Methuen com a Inglaterra (IVV, 2018).

Atualmente, a indústria é regulamentada por diretivas europeias, que podem ainda ser complementadas por legislações nacionais. A nível internacional, a International Organisation of Vine and Wine (OIV), estabelecida em 2001, é a entidade de referência no domínio das vinhas e do vinho, das bebidas à base de vinho, das uvas de mesa, das passas secas e de outros produtos derivados da vinha.



Figura 1. Logótipo da OIV (OIV, 2018).

Trata-se de uma organização intergovernamental que tem como principal missão harmonizar as práticas enológicas e *standard* entre as várias nações, mantendo os interesses dos consumidores em primeiro lugar. Aos 35 países fundadores juntaram-se outras nações, sendo que a organização é atualmente composta por 46 estados membros.

De acordo com o Regulamento EU n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do seu Conselho, de 17 de dezembro, pode ser considerado como vinho qualquer produto obtido

exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mostos de uvas.

Ainda consoante o mesmo regulamento, as uvas tratam-se de frutos de videira utilizados para vinificação, maduros ou mesmo ligeiramente passados, suscetíveis de serem esmagados ou espremidos com os meios normais de adega e de originarem espontaneamente uma fermentação alcoólica. O mesmo regulamento define, ainda, os mostos como o produto líquido obtido naturalmente ou por processos físicos a partir de uvas frescas, não podendo possuir um título alcoométrico superior a 1 %.

Na categoria de Vinhos Verdes podem ser incluídos vinhos brancos, tintos e rosados que, além da Denominação de Origem (DO) podem, ainda, ter a denominação da sub-região de origem, desde que os produtos sejam obtidos a partir de uvas produzidas e vinificadas exclusivamente na sub-região. A denominação abrange, ainda, outros produtos vínicos como espumantes, aguardentes vínicas e bagaceiras e vinagres (CVRVV, 2015).

Apesar de a Região Demarcada dos Vinhos Verdes só ter surgido oficialmente em 1908, com a publicação do artigo 10º da Carta de Lei de 18 de setembro e, posteriormente, do artigo 19º do Decreto de 1 de outubro, desde o século I que há referências à existência de vinho nessa região (CVRVV, 2018).

Em 1926, com o Decreto n.º 12.866, de 10 de dezembro, é reconfirmada a delimitação da região e é criada a Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV). Desde essa data, a instituição tem como missões certificar, controlar e promover os produtos vínicos denominados de Vinho Verde, dinamizar e promover a melhoria da qualidade da vinha e defender o património. Desde essa data, várias alterações têm sido feitas aos regulamentos, para melhor corresponder às expectativas dos mercados (CVRVV, 2018).

A área abrangida pela DO engloba, geograficamente, a totalidade dos distritos de Braga e Viana do Castelo e algumas freguesias e municípios dos distritos de Aveiro, Porto, Vila Real e Viseu. No que diz respeito a sub-regiões, são reconhecidas 9 designações: Amarante, Ave, Baião, Basto, Cávado, Lima, Monção e Melgaço, Paiva e Sousa (CVRVV, 2015).

2.1.1 As particularidades da região dos Vinhos Verdes

Em primeiro lugar, é necessário relembrar que o Vinho Verde se trata de um produto abrangido por DO, pelo que obedece a requisitos e legislações específicas que englobam a totalidade do processo produtivo, desde as castas utilizadas, os métodos de vinificação e as características organoléticas do produto final (CVRVV, 2018).

Na Figura 2 estão representadas as várias sub-regiões, bem como as principais cidades por elas abrangidas.



Figura 2. Sub-regiões da região dos Vinhos Verdes (“Vinho Verde Wine Fest,” 2018).

Na região, o clima é caracterizado pelas temperaturas e amplitudes térmicas moderadas, pluviosidade elevada (concentrada no inverno e na primavera) e baixa insolação (devido à proximidade ao oceano), sendo considerado um clima temperado húmido (Climaco *et al.*, 2012; Oliveira, 2000).

Quanto ao relevo, a topografia é bastante irregular, sendo recortada por uma densa rede de vales associada à rede fluvial. Os solos da região são maioritariamente assentes em

formações graníticas, com pouca profundidade, pobres em fósforo e potássio e com acidez natural elevada (Oliveira, 2000).

Devido à grande humidade, as vinhas estão sujeitas ao desenvolvimento de doenças causadas por bolores, nomeadamente o míldio (*Plasmopara vitícola*), podridão-cinzenta (*Botrytis cinerea*) e escoriose (*Phomopsis vitícola*). Além disso, as geadas do início da primavera e os granizos e trovoadas do fim da estação podem por em risco as colheitas (Climaco *et al.*, 2012).

No panorama da região, as castas brancas são as que correspondem a uma maior área de produção, representando quatro das cinco castas com maior área cadastrada. Entre elas, a mais relevante é a casta Loureiro, seguida das castas Arinto/Pedernã, Alvarinho, Trajadura/Treixadura. Quanto à zona de produção, o concelho de Amarante regista os valores mais altos para a área de vinha declarada, tendência que se tem mantido desde 2005 (CVRVV, 2018).

Na Tabela 1 são apresentadas as principais características das castas brancas mais representativas da Região dos Vinhos Verdes, comparando os seus bagos, polpa e características do vinho resultante.

Tabela 1. Principais características das castas dominantes na região dos Vinhos Verdes, adaptado de (Meireles, 2013; Oliveira, 2000)

	Loureiro	Arinto	Alvarinho	Trajadura
Tamanho dos bagos	Médio	Pequeno	Médio	Médio
Cor dos bagos	Verde-amarelada	Verde-amarelada	Verde-amarelada a rosada	Verde-amarelada
Polpa	Pouco succulenta	Succulenta	Succulenta e mole	Pouco succulenta
Grau alcoólico provável	Baixo a médio	Médio	Elevado	Baixo
Acidez	Média a elevada	Elevada	Elevada	Baixa
Sensibilidade à oxidação	Moderada	Reduzida	Moderada	Elevada
Capacidade de envelhecimento	Reduzida	Elevada	Elevada	Moderada
Aromas	Encorpados, frescos e harmoniosos	Cítricos e discretos	Acentuados e harmoniosos	Delicados, frutados e pouco intensos

Num produto, quando é apresentada na rotulagem a menção à casta Alvarinho em conjunto com outras castas, esta deve representar uma percentagem igual ou superior a 30 %. Se apenas for mencionada a presença de Alvarinho, esta deve corresponder à totalidade do produto (CVRVV, 2015).

Na Figura 3 estão apresentados, da esquerda para a direita, o formato das folhas e bagos das castas Loureiro, Arinto/Pedernã, Alvarinho e Trajadura.

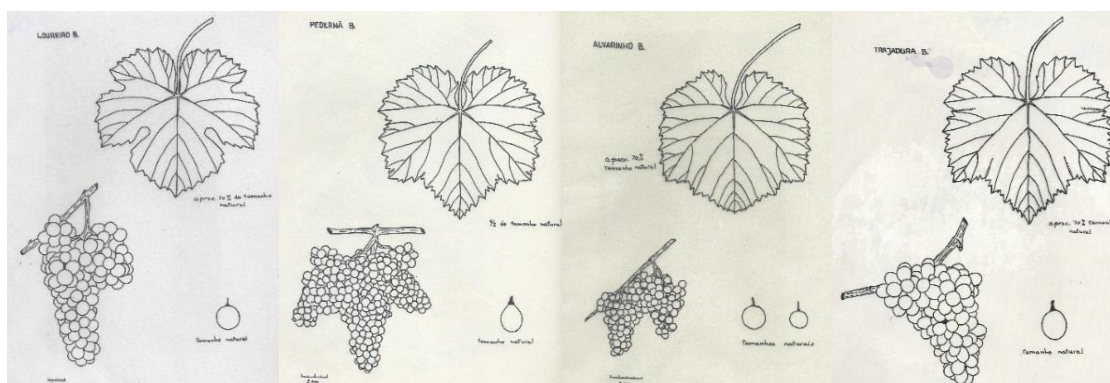


Figura 3. Esquema das folhas e bagos das principais castas de Vinho Verde branco (Oliveira, 2000).

Para que o produto possa ser comercializado como Vinho Verde tem de cumprir vários requisitos relacionados com a sua rastreabilidade e qualidade. Um dos primeiros requisitos é a obrigatoriedade de que todos os produtores e comerciantes que operem com produtos ainda não embalados e rotulados efetuem a sua inscrição na entidade certificadora. As instalações, que também devem estar identificadas, têm de estar localizadas dentro da área geográfica delimitada e ser exclusivas para os produtos com DO, com exceção das instalações de armazenagem e pré-embalagem. As parcelas de vinha têm de estar cadastradas no Registo Central Vitícola (RCV) (CVRVV, 2015).

A etapa seguinte no processo de certificação, obrigatória para todos os vitivinicultores e produtores, trata-se do preenchimento da Declaração de Colheita e Produção (DCP). É com base no cruzamento entre os dados do RCV e da DCP que é calculado o rendimento por hectare. Dos vários requisitos, sublinha-se que existe a limitação para o rendimento máximo por hectare das vinhas em 10 666 kg, salvo exceções, e que o rendimento em mosto resultante da separação dos bagaços, por cada 100 kg de uvas, não pode ultrapassar os 75 L, sendo o limite reduzido pra 65 L no caso da casta Alvarinho (CVRVV, 2015).

O Regulamento CE n.º 479/2008 exige que seja feita anualmente uma verificação, por parte da autoridade controladora, das características organoléticas e analíticas dos

produtos com DO, englobando a determinação do título alcoométrico total e adquirido, açúcares totais (expressos em frutose e glucose), acidez total, acidez volátil, dióxido de enxofre total e um exame organolético do aroma, sabor e aspeto visual. Os produtos que não satisfaçam as condições previstas nesse regulamento, mas cumpram as restantes exigências legais, podem ser comercializados, mas sem a DO. Para os Vinhos Verdes, essas análises são efetuadas no laboratório da CVRVV, um laboratório acreditado.

Para os parâmetros organoléticos, a avaliação é efetuada pela Câmara de Provedores e o resultado de cada parâmetro deve traduzir a maioria das opiniões formuladas individualmente pelos provedores que a integram.

Quanto à limpidez, o Vinho Verde deve apresentar-se límpido ou ligeiramente opalino. No caso de ser um vinho opalino, a rotulagem tem de especificar a suscetibilidade de originar um depósito. Quanto à cor, esta deve estar situada entre o citrino descolorado e o ligeiramente dourado, para os vinhos brancos. Para o aroma e sabor, os requisitos mínimos são a ausência de defeito marcado, qualidade suficiente e tipicidade, conforme as escalas de avaliação. O Vinho Verde de casta deve, também, evidenciar esta e ter uma notação igual ou superior a seis. O Vinho Verde com indicação de sub-região ou com designativo de qualidade deve apresentar características organoléticas destacadas, com notação superior ou igual a seis para a sub-região (CVRVV, 2018).

Para a quantificação dos parâmetros físico-químicos é feita uma série de ensaios, que incluem a determinação de acidez (fixa e volátil), ácidos presentes no meio (ascórbico, cítrico e sórbico), cinzas, cloretos, cobre, dióxido de carbono, extrato não redutor, sacarose, sulfatos, título alcoométrico volúmico adquirido e total. Para cada um dos parâmetros existe uma gama de valores aceitáveis que os produtos têm de cumprir.

O Regulamento CE n.º 479/2008 explicita ainda que nos registos devem ser indicadas as operações de aumento do título alcoométrico, acidificação e desacidificação, lotação, engarrafamento, casos de adição de álcool, tratamento por eletrodialise ou permuta catiónica para estabilização tartárica do vinho bem como a utilização experimental de novas práticas enológicas, incluindo a referência adequada à autorização dada pelo Estado-Membro em causa e a utilização de dióxido de enxofre, entre outras. Deve ser registada a operação e a data, a quantidade de produto obtido e quais os recipientes e equipamentos envolvidos.

Quanto à rotulagem, está estabelecido que é obrigatória a menção de “Vinho Verde”, “Denominação de Origem Controlada”, o volume nominal, título alcoométrico volúmico adquirido, lote, identificação do engarrafador e marca. Consoante as características do produto, pode também apresentar as menções de “Sujeito a Depósito”, “Palhete”, “Vindima Tardia” e a indicação de proveniência. Além destes, é necessário especificar todos os ingredientes ou auxiliares tecnológicos que provoquem alergias ou intolerâncias: sulfitos se a concentração for superior a 10 mg L^{-1} , leite e produtos à base de leite, ovos e produtos à base de ovos se a sua presença for detetável no produto final. A menção desses alérgenos pode ser acompanhada de um pictograma referente aos produtos, como apresentado na Figura 4 (CVRVV, 2018).



Figura 4. Pictogramas para menção dos alérgenos presentes no vinho (CVRVV, 2018).

Só quando existe cumprimento de todos os requisitos físico-químicos, sensoriais e de rotulagem é que os produtos podem ostentar o selo de garantia. Na Figura 5 apresenta-se o selo de garantia em vigor desde janeiro de 2012.



Figura 5. Selo de garantia para Vinhos Verdes (CVRVV, 2018).

A atribuição dos selos de garantia é responsabilidade da CVRVV e surgiu da necessidade de salvaguardar a autenticidade, origem e qualidade dos produtos com denominação de Vinho Verde. O primeiro selo de garantia surgiu em 1959, e foi sofrendo alterações visuais até aos dias de hoje. Atualmente, o selo de garantia em vigor corresponde ao quarto design. Cada selo de garantia é individualizado, possuindo códigos de segurança que permitem o seu controlo (CVRVV, 2018).

Na página da CVRVV é possível ao consumidor, através da introdução do código único impresso no selo de garantia da garrafa, ter acesso à data de engarrafamento e de certificação, entre outras informações complementares às mencionadas no rótulo. O processo permite ainda verificar possíveis fraudes de certificação e reportá-las de forma imediata à comissão reguladora para posterior investigação.

2.1.2 O processo de produção do Vinho Verde branco

Para obter um Vinho Verde branco de qualidade, é preciso ter em atenção várias etapas além da vinificação propriamente dita, uma vez que o processo também engloba a fase de viticultura, na qual são realizadas as intervenções no solo e na vinha (CVRVV, 2018).

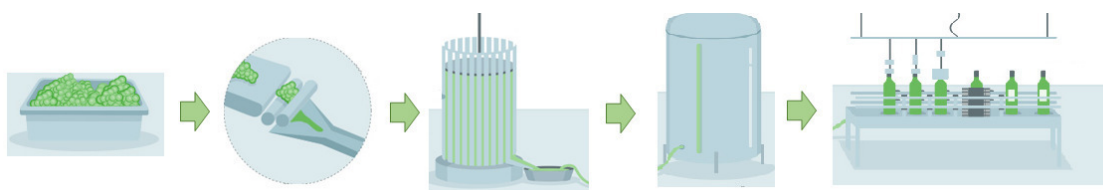
Depois de escolhida a casta a plantar e do terreno a utilizar, a viticultura começa com o tratamento do solo para receber a vinha, sendo feitas as correções de pH e adição de nutrientes necessários. As plantas devem ser colocadas no novo solo durante a época de repouso vegetativo e recorrendo a videiras já enxertadas, sendo privilegiada uma plantação no sentido Norte-Sul para permitir um melhor aproveitamento da luz solar. Estando as plantas já em crescimento, é necessário manter quatro cuidados ao longo do ano: a manutenção das características do solo, a rega, as intervenções em verde (desponta, desfolha, orientação da vegetação e desladramento) para otimizar o crescimento e maturação dos cachos e a aplicação de tratamentos fitossanitários para combater as pragas. Reduzindo ou eliminando as secções da planta menos produtivas (excesso de rebentos e folhas), é possível facilitar o arejamento e alcance da luz solar e a capacidade e maturação dos bagos restantes (CVRVV, 2018; Jackson, 2008).

A última etapa da viticultura é a determinação da altura ideal para a vindima e o processo em si. Visto que, durante o processo de maturação, as uvas vão alterando a sua cor e ocorre uma diminuição dos taninos e ácidos orgânicos e um aumento da concentração de açúcares, compostos corantes e aromáticos, é de extrema importância efetuar a vindima quando as uvas estão suficientemente maduras, mas ainda bem conservadas. Para tal, deve ser feita a monitorização visual da coloração da película dos bagos, confirmar se as grainhas apresentam um tom acastanhado, a facilidade com que os bagos se desprendem do cacho e a sensação de doçura. Estes métodos simples e empíricos devem ser complementados com a determinação do teor em álcool provável e da acidez total. Na etapa de vindima, é feita a recolha das uvas, desprezando as que não se

encontram suficientemente maduras e as que apresentam sinais evidentes de doença (CVRVV, 2018; Horsey, 2007). Este processo de recolha pode ser efetuado de forma mecânica ou manual, sendo que o primeiro processo é mais penalizador para a planta e apenas pode ser utilizado em vinhas planeadas para tal, com espaço suficiente entre cada planta para operar a máquina de vindima, mas permite reduzir a mão de obra-necessária e a duração da recolha. Devido à antiguidade do Vinho Verde e das suas vinhas, não é comum a sua aptidão para a vindima mecânica, sendo o processo manual o mais utilizado. Este permite uma escolha individualizada de cada bago a recolher, sendo uma mais-valia na qualidade do produto final.

Com a receção dos bagos na adega, começa a etapa de vinificação, cujos processos principais são o desengace/esmagamento, prensagem, decantação, fermentação, trasfega, clarificação e engarrafamento. Estas etapas encontram-se esquematizadas na Figura 6.

O processo de produção de vinho é semelhante para os tintos ou brancos, sendo que a única diferença está na altura da fermentação: nos vinhos brancos a fermentação ocorre depois da prensagem, enquanto que nos vinhos tintos a fermentação ocorre logo no início do processo, antes da prensagem (CVRVV, 2018; Horsey, 2007; Infovini, 2009). Por esta razão, a fermentação dos vinhos tintos ocorre na presença das massas sólidas de uvas até se atingir a densidade desejada, após a qual ocorre uma transfega e prensagem, continuando a fermentação já na ausência das massas. Esta diferença entre processos permite ao Vinho Verde Tinto adquirir a cor e paladar ricos e complexos apreciados pelos consumidores, por oposição à tonalidade límpida e paladar fresco e frutal desejados no Vinho Verde branco.



Receção → Esmagamento → Prensagem → Fermentação → Engarrafamento

Figura 6. Esquema das principais etapas da produção de vinho, adaptado de (CVRVV, 2018).

O desengace é a separação das uvas dos restantes constituintes da videira recolhidos durante a vindima (principalmente folhas e caules), de forma a evitar que o alto conteúdo fenólico presente nos caules (originam amargor e adstringência) e os aldeídos e álcoois

presentes nas folhas (resultam em aromas herbáceos) passem para o mosto. No mesmo equipamento, e com o menor intervalo temporal possível, também é realizado o esmagamento dos bagos de uva recolhidos, libertando o sumo contido no seu interior. Neste processo, é importante evitar o esmagamento das grainhas, para que os óleos nelas contidos não contaminem o mosto (Jackson, 2008). Idealmente, estes dois processos são efetuados mal as uvas cheguem à adega, uma vez que durante a colheita e transporte ocorrem algumas lesões nas mesmas, originando reações de oxidação por exposição ao ar e inoculação do sumo com os microrganismos presentes na superfície da uva, processo que pode levar a um crescimento microbiano descontrolado se estiver uma temperatura elevada.

Dependendo da preferência do produtor, pode ser promovida a maceração. Nesta etapa, a polpa resultante sofre a ação das enzimas hidrolíticas presentes nas cascas. Minimizar o processo de maceração e operar a baixas temperaturas reduz a assimilação dos compostos aromatizantes, originando um vinho fresco e frutado, com poucas proteínas instáveis termicamente, enquanto um processo de maturação mais longo e quente dá origem a vinhos com cor e sabores mais intensos e complexos (Jackson, 2008).

A prensagem por longos períodos de tempo associada a pressões muito baixas, num regime suave, origina vinhos brancos de maior qualidade mas, devido ao tempo necessário para o processo, nem sempre é possível. Uma alternativa é a técnica de prensar as uvas inteiras, resultando num baixo teor de sólidos, com reduzidos compostos fenólicos e sabor delicado (Horsey, 2007).

Antes da fermentação, o mosto é clarificado, geralmente por decantação. A remoção da matéria suspensa é importante para minimizar os processos de oxidação induzidos por enzimas. No entanto, o excesso de clarificação também não é desejado, uma vez que pode resultar em fermentações mais lentas (por remoção excessiva dos compostos necessários para a atividade metabólica dos microrganismos envolvidos na fermentação), colocar em risco a viabilidade das leveduras alvo (devido à falta de nutrientes essenciais à sua reprodução) e originar uma produção excessiva de ácido acético durante a fermentação. Métodos mais recentes envolvem o uso de terra de diatomáceas como rede de filtração ou a centrifugação (Horsey, 2007; Jackson, 2008).

Para preparar o mosto para a fermentação pode ser necessário fazer ajustes quanto ao pH e acidez total, acrescentando ácidos orgânicos (geralmente ácido tartárico), de forma

a atingir valores mais elevados e garantir o envelhecimento correto do vinho e proteger da degradação causada por microrganismos. Da mesma forma, pode ser necessária a desacidificação com recurso a carbonatos de cálcio e potássio. De acordo com o Decreto-Lei n.º 251-A/2015, de 17 de dezembro, quando os açúcares presentes no meio não são suficientes para se obter o teor alcoólico desejado, é possível recorrer a processos de concentração do mosto, sendo permitido um aumento máximo do título alcoométrico volúmico natural de 1.5 %. Como processos autorizados para esse aumento destacam-se a osmose inversa (desde que o volume final não seja reduzido em mais de 20 %) e a adição de mosto concentrado retificado (desde que esta não aumente o volume inicial em mais de 6.5 %). Outros ajustes podem incluir uma termovinificação (um processo de aquecimento do mosto até 80 °C por curtos períodos de tempo) para realçar a cor e a libertação de antocianinas, adição de enzimas para facilitar a clarificação e realçar aromas e sabores e até a adição de nitrogénio, sob a forma de sais, e vitaminas, para otimizar a fermentação. É também nesta etapa que é feita a adição de dióxido de enxofre, para preservar o mosto (Jackson, 2008).

A fermentação é o processo de produção de energia no qual o dador e o recetor final dos eletrões são ambos compostos orgânicos, não sendo necessária a intervenção do oxigénio molecular. No caso da fermentação alcoólica, a glucose é o substrato preferencial e o etanol atua como recetor de eletrões. Ocorre tipicamente em equipamentos de aço inoxidável, mas é possível ser feita de forma tradicional em barris de carvalho. Para a sobrevivência dos ésteres que conferem os aromas frutados, são utilizadas temperaturas moderadas (a rondar os 20 °C). Geralmente, a fermentação dos vinhos brancos é incompleta, ficando açúcares residuais no meio. Isto pode ser conseguido com recurso a um arrefecimento rápido ou inativando os microrganismos antes de estes consumirem todos os açúcares fermentáveis presentes no mosto.

Dos vários microrganismos com capacidade de fermentar, a *Saccharomyces cerevisiae* pertence aos poucos que opta preferencialmente pela fermentação, mesmo quando na presença de oxigénio, consegue suportar concentrações moderadas de etanol, é osmotolerante e pouco sensível às variações de acidez, razões pelas quais está perfeitamente adaptada a desenvolver-se no mosto e dominar os outros microrganismos presentes, sendo o microrganismo escolhido pelos produtores. Como não é possível garantir a sua presença nas concentrações desejadas no mosto, este é frequentemente inoculado com uma estirpe comercial da levedura, que pode ser selecionada de modo a

controlar os compostos secundários resultantes da fermentação (Horsey, 2007; Jackson, 2008).

Na Região dos Vinhos Verdes, a levedura predominante na vinificação de brancos corresponde a uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae bayanus* isolada pela CVRVV em parceria com outras instituições e vendida sob a denominação de levedura QA23, nome que remete ao seu local de origem, a Quinta de Azevedo. Trata-se de uma levedura que oferece uma elevada segurança na vinificação devido à sua cinética de fermentação rápida, tolerância de uma ampla gama de temperaturas (15 °C a 32 °C), muito baixa exigência de azoto assimilável e baixa necessidade de oxigénio. Além disso, é reconhecida pelo seu impacto positivo no perfil organolético do vinho, devido á boa aptidão para a produção de aromas frutados e apetência para revelar aromas primários varietais (limão verde, toranja) em castas brancas aromáticas (CVRVV, 2018).

Depois da fermentação é efetuada uma nova trasfega, para remover as borras e resíduos dos microrganismos utilizados durante esta. Nesta fase é possível uma nova adição de dióxido de enxofre para evitar fermentações adicionais, principalmente a malolática e acética, e manter as populações microbianas sobre controle.

Antes do engarrafamento, pode ser feita uma última etapa de clarificação e estabilização, prevenindo a precipitação de compostos metálicos e proteicos e a oxidação, pois afetam a perceção do consumidor (Horsey, 2007).

2.1.3 Segurança Alimentar

Relacionado com o processo de produção está, também, a implementação do sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP). Este sistema é a base para o controlo alimentar, tanto do ponto de vista higiénico como do ponto de vista microbiológico, e funciona com base numa abordagem sistemática que pretende garantir o controlo eficiente através da identificação de etapas - “pontos”, onde se podem controlar os perigos para a saúde do consumidor. Da necessidade de criar um referencial único com reconhecimento internacional, surgiu a norma ISO 22000, que define os requisitos para os Sistemas de Gestão da Segurança Alimentar, indo além dos pré-requisitos, boas práticas e da metodologia HACCP (Silva, 2017).

Os pré-requisitos permitem reduzir a ocorrência dos perigos gerais da empresa, englobando códigos de boas práticas de fabrico, de higiene e agrícolas, bem como questões de construção, controlo de pragas e escolha de materiais. Depois da implementação dos pré-requisitos, os perigos específicos do processo ou do produto são tratados de acordo com a Metodologia HACCP, na qual é necessário considerar sete princípios associados a várias etapas (ASAE, 2018; Silva, 2017).

Das etapas, sublinha-se a importância da Identificação de Perigos, que podem ser divididos entre biológicos (microrganismos), químicos (pesticidas, aditivos, toxinas) e físicos (fragmentos de materiais estranhos ao produto), e da Identificação de Pontos Críticos de Controlo, etapa onde é possível prevenir, diminuir ou eliminar um perigo considerado como significativo.

No caso do vinho, foram identificados como perigos químicos mais relevantes a Ocratoxina A, o chumbo, os resíduos de desinfetantes e de óleos lubrificantes provenientes dos equipamentos mecânicos utilizados durante o processo, sulfitos adicionados para controlo dos microrganismos, resíduos de tratamentos fitossanitários e produtos enológicos (sais de amónio, ácido sórbico, ascórbico e metatártico, dióxido de carbono e tiamina) adicionados pelos produtores de forma a melhorar a estabilidade e qualidade do produto final. Destes perigos, a maioria pode ser resolvida cumprindo as boas práticas de higiene e fabrico, pelo que tem uma probabilidade de ocorrência baixa, sendo pouco significativo. Os perigos associados a um fator de risco significativo passam pela existência de químicos (sulfitos) adicionados excessivamente e a quebra de garrafas (originando resíduos de vidro), sendo estes os dois Pontos de Controlo Críticos do processo produtivo (Pinto, 2015).

Quanto às micotoxinas, em particular à Ocratoxina A, existe um código de boas práticas no *Codex Alimentarius* que refere que esta contaminação é devido à presença de bolores, especialmente da espécie *Aspergillus* (*A. carbonarius* e *A. niger*) nas uvas. O documento menciona a necessidade de otimizar a zona de implantação da vinha, preferindo locais arejados e pouco húmidos e minimizando o contacto dos frutos com o solo, bem como de efetuar o controlo de animais que possam difundir doenças e diminuir a integridade física dos bagos. É também necessário controlar a data de vindima, uma vez que as uvas extensivamente contaminadas pelos bolores não podem ser usadas para a produção de vinho, servindo apenas para destilação (FAO, 2007). Existe uma exceção

a esta contaminação por bolores, sendo os vinhos com menção “colheita tardia” produzidos a partir de uvas afetadas pela “podridão nobre”, nome associado ao fungo *Botrytis cinerea*. Este fungo, ao cobrir a pele das uvas, promove a desidratação das uvas permitindo que estas concentrem os seus compostos, originando vinhos mais doces e com aromas de mel e flores mais intensos.

A mesma organização elaborou uma série de recomendações quanto ao uso de aditivos alimentares na produção de vinho, incluindo emulsificantes, estabilizadores, espessantes, reguladores de acidez e antioxidantes. Além de regulados pelo valor diário recomendado, os aditivos devem ser usados de uma forma que previna a modificação das características naturais e essenciais do vinho e da sua composição (FAO & WHO, 2016).

2.1.4 Impactes Ambientais

A nível de impacte ambiental, os aspetos mais relevantes do processo são os resíduos e efluentes provocados pelos processos de fertilização do solo, sulfitação e subsequente remoção e queima de combustíveis fósseis nos veículos usados para transporte das mercadorias (Machado, 2011; Santos, 2010). Relembra-se que o processo de remoção do dióxido de enxofre (SO₂) antes da fermentação é baseado na evaporação deste numa coluna de destilação fracionada, sendo o ácido sulfuroso resultante neutralizado num banho de óxido de cálcio. Todos estes compostos correspondem a efluentes requerendo tratamento antes da sua libertação para o meio reforçando, assim, a necessidade de substituir o processo de estabilização do mosto por um método amigo do ambiente.

A nível de consumo de água, cada 0.75 L de vinho implicam uma pegada de 438 L de água, sendo a viticultura responsável por 90 % do consumo associado (Pina, 2010). Sendo que o mosto contendo SO₂ é aquecido antes de entrar na coluna de destilação recorrendo a um permutador de calor, este processo também requer a utilização de vapor de água deixando, novamente, margem para a diminuição do seu impacte ambiental.

2.2 Microflora natural do mosto e a sua influência no vinho

No mosto e no vinho há vários géneros de microrganismos que exercem a sua influência: leveduras, bactérias e fungos, que se encontram em constante equilíbrio e

interagem entre si. Na Figura 7 estão representadas as concentrações relativas dos microrganismos mais comuns, durante um processo típico de produção de vinho.

A partir do momento em que as uvas são esmagadas, os primeiros microrganismos que se desenvolvem são as leveduras e as bactérias ácidas lácticas, de entre as quais se destaca a *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Com o início da fermentação alcoólica as leveduras tornam-se nos microrganismos dominantes e as concentrações de bactérias baixam para valores quase indetetáveis. Com o aumento do teor de etanol resultante da fermentação, o equilíbrio entre as espécies de levedura também sofre alterações: se no início predominam *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e outras espécies menos tolerantes ao stress induzido pelo etanol, estas são rapidamente substituídas por outras leveduras mais tolerantes como *Saccharomyces cerevisiae*. No final desta etapa, ocorre a fermentação malolática, levando a um aumento do pH e CO₂ dissolvido no meio e a uma diminuição dos açúcares fermentáveis, condições em que *O. oeni* se destaca dos restantes microrganismos (König *et al.*, 2009).

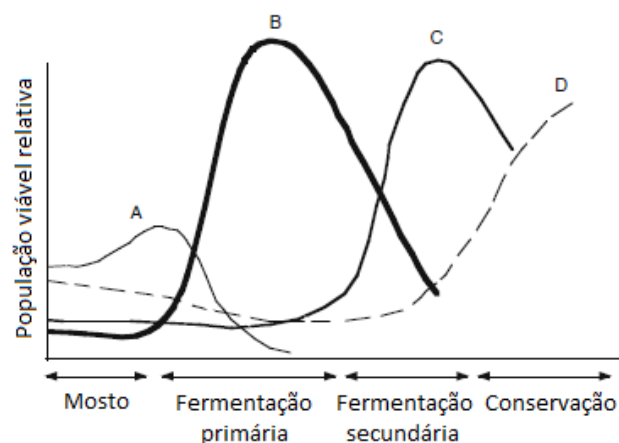


Figura 7. Variação das espécies de (A) leveduras não *Saccharomyces*, (B) *Saccharomyces*, (C) *Oenococcus oeni*, e (D) leveduras e/ou bactérias de degradação durante a produção de vinho, adaptado de (Fugelsang & Edwards, 2007).

Os fungos, dos quais se destacam os filamentosos, têm a sua ação localizada nos instantes antecedentes à fermentação alcoólica: a temperaturas próximas dos 20 °C a sua sensibilidade ao etanol diminui, mas mantém-se significativa. Espécies como *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. estão associados a defeitos conhecidos no vinho, devido à sua produção de ácido acético (König *et al.*, 2009).

Além das bactérias ácidas lácticas, também as bactérias ácidas acéticas podem ser encontradas naturalmente neste produto: nas uvas sãs é detetável a presença de

Gluconobacter oxydans, sendo que nas uvas em estado de decomposição esta espécie, assim como as espécies de *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* atingem concentrações extremamente elevadas. Estas bactérias são capazes de produzir compostos que inibem o crescimento de leveduras, colocando em risco o arranque das fermentações espontâneas, mas o seu principal inconveniente é a libertação para o meio de ácidos voláteis. Apesar de não haver um método capaz de as eliminar completamente, uma vez que são tolerantes a concentrações de SO_2 até 30 mg L^{-1} , uma boa higiene na adega e a escolha de uvas intactas é capaz de prevenir a sua propagação na produção de vinho, pelo que não são os microrganismos de degradação mais preocupantes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

2.2.1 Fatores que afetam a cinética do crescimento microbiano

Quando se analisa o crescimento microbiano num sistema *batch* ideal, todos os recursos são finitos e não renováveis e os metabolitos produzidos pelas células, juntamente com as células mortas, acumulam-se no sistema. Neste tipo de sistemas, o crescimento da população microbiana passa por quatro fases principais: uma de latência, uma de crescimento exponencial, uma estacionária e uma de decréscimo.

Na indústria alimentar, a última fase não é de grande interesse uma vez que os alimentos se encontram impróprios para consumo muito antes dessa etapa ser atingida. Medindo o número de células vivas em função do tempo, obtém-se a curva específica de crescimento para um determinado microrganismo, nas condições operacionais estabelecidas (Micha & Corradini, 2011).

Recorrendo a modelos estatísticos, é possível determinar as constantes específicas de crescimento e até prever o comportamento quando se alteram diversas condições. Independentemente do modelo, os parâmetros mais relevantes a serem determinados são o tempo de latência (λ), a taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}) e a concentração máxima de microrganismos (N_{max}) (Micha & Corradini, 2011)

Um dos métodos mais utilizados é a descrição da curva de crescimento microbiana pelo Modelo Logístico, também conhecido como Modelo de Verhulst. A maior desvantagem deste modelo é que, quando os dados são representados numa escala semilogarítmica, o ajuste é imperfeito nos casos em que a fase estacionária é muito

extensa (Micha & Corradini, 2011). O modelo pode ser descrito pela Equação 1, abaixo apresentada, na qual N_t representa o tamanho da população num determinado tempo t , N_0 corresponde ao tamanho da população no instante inicial e μ é a taxa intrínseca de crescimento dessa população.

$$N_t = \frac{N_{max}}{1 + \left(\frac{N_{max} - N_0}{N_0}\right)e^{-\mu t}} \quad \text{Equação 1}$$

Uma vez que o principal objetivo do trabalho é a inativação das leveduras de degradação do mosto e vinho, é nestes microrganismos que se irá focar esta secção. Sendo a *Saccharomyces cerevisiae* uma das leveduras modelo mais estudada e de fulcral importância na produção de vinho (é a levedura mais escolhida pelos produtores para realizar a fermentação), o seu caso será explicado em maior detalhe.

Necessidades nutricionais

No mosto, os açúcares como a glucose e frutose representam a fonte de carbono e energia para os microrganismos. Além destes, um dos nutrientes fundamentais para as leveduras é o azoto, que pode ser assimilado a partir de fontes orgânicas (aminoácidos) e inorgânicas (amoníaco ou ião amónio), sendo este último transformado em glutamato, que permite à célula produzir aminoácidos importantes para o seu metabolismo. O fosfato, um composto que corresponde a 3 % a 5 % do peso seco da levedura, é um constituinte dos ácidos nucleicos, intermediários metabólicos como o ATP e fosfolípidos, cuja assimilação é dependente da presença de potássio, razão pela qual a sua ausência origina fermentações alcoólicas lentas ou interrompidas (Fugelsang & Edwards, 2007).

Também vários minerais são necessários, pelas funções regulatórias que possuem nas enzimas envolvidas na fermentação, e vitaminas, como a tiamina e a biotina, que têm um papel ativo na síntese de compostos intracelulares essenciais à manutenção celular (Fugelsang & Edwards, 2007).

Apesar de algumas leveduras serem capazes de se desenvolver em condições anaeróbias, o oxigénio é necessário para a síntese de vários metabolitos fundamentais para a sobrevivência da célula, e podem inclusive prolongar a sua capacidade fermentativa e libertação de aromas e outros voláteis (Fugelsang & Edwards, 2007).

Metabolismo

Uma das características mais importantes nas leveduras de vinificação é a sua regulação do consumo dos açúcares disponíveis no meio. O efeito Pasteur positivo, também conhecido como Crabtree negativo, refere-se à inibição que a fermentação sofre, em prol da respiração. Na Tabela 2 apresentam-se as leveduras mais relevantes, consoante o seu efeito Crabtree.

Leveduras consideradas como Crabtree positivas só metabolizam os açúcares por via fermentativa mesmo na presença de oxigénio e quando as concentrações de açúcares no meio são elevadas. No caso *S. cerevisiae* esse mecanismo ocorre para concentrações superiores a 9 g L⁻¹, valor muito inferior ao teor em açúcares médio de um mosto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Tabela 2. Classificação das leveduras mais relevantes na indústria dos vinhos, consoante o efeito Crabtree, traduzido de (König *et al.*, 2009)

Leveduras Crabtree positivas	Leveduras Crabtree negativas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Brettanomyces intermedius</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Torulopsis glabrata</i>	<i>Hansenula neofermentans</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Candida stellata</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>

Fatores de stress e de morte

Um fator de stress é qualquer parâmetro ambiental com capacidade de influenciar negativamente o crescimento dos microrganismos. Durante o processo de vinificação, *S. cerevisiae* pode encontrar condições de crescimento indesejáveis, como meios hipertónicos ou hipotónicos, limitações de substrato, falta de azoto, excesso de sulfitos, baixo pH, stress oxidativo e amplitudes térmicas elevadas, tendo um mecanismo para lidar com cada uma dessas alterações. Quando os fatores de stress se manifestam numa gama superior àquela que o microrganismo consegue suportar, o microrganismo morre.

Como a concentração de açúcares no mosto de Vinho Verde varia, normalmente, entre 170 g L⁻¹ e 240 g L⁻¹, a pressão osmótica resultante é contrariada pela acumulação

intracelular de glicerol na célula, enquanto que no caso oposto (frequente na preparação de culturas de arranque), as células evitam a lise celular ativando um fator de transcrição que impulsiona a expressão de genes que codificam proteínas fundamentais para a reconstrução da parede celular, reforçando essa estrutura. No caso do aumento da temperatura para valores superiores a 30 °C mas dentro da gama sub-letal, é possível que ocorra a reparação das proteínas desnaturadas ou a sua degradação, num processo autorregulado. O stress oxidativo é um acontecimento comum durante a vinificação mas pode causar danos celulares, pelo que as células possuem fatores de transcrição alvo que, quando oxidados, ativam a transcrição de genes que levam à síntese de enzimas para desintoxicação (catalase e dismutase) e de protetores (König *et al.*, 2009).

2.2.2 Microrganismos de degradação

Os mostos de uva contêm, para além de *S. cerevisiae*, uma mistura de diferentes leveduras que podem formar metabolitos benéficos para a qualidade do vinho, mas também podem originar níveis elevados de ácidos voláteis e compostos aromáticos indesejados, razão pela qual são muitas vezes considerados como microrganismos associados à degradação pelos produtores.

Das mais de 40 espécies que já foram identificadas nos mostos, a maioria desaparece nos primeiros instantes da fermentação, devido à inibição pelo baixo pH, elevado teor em etanol, deficiência em oxigénio, efeito do SO₂ e limitação de nutrientes devido à dominância de *S. cerevisiae* no meio, existindo, no entanto, espécies como *Z. bailli* e *Pichia* spp. capazes de resistir à fermentação (Jolly *et al.*, 2014).

Vários autores reportam o uso deliberado das leveduras de degradação para a produção de vinho. Em geral, uma fermentação espontânea permite o desenvolvimento das espécies nativas, originando vinhos com uma maior complexidade de aromas, mas com pouco controlo microbiológico. No outro extremo do processo, a esterilização do mosto seguida de inoculação com *S. cerevisiae* permite o controlo desejado mas reduz a complexidade do produto, pelo que uma cultura mista representa um compromisso entre as duas situações (Padilla *et al.*, 2016). Numa fermentação espontânea típica, a sucessão de microrganismos que ocorre é a seguinte (Horsey, 2007):

Kloeckera spp. → *Hansenula* spp. → *S. cerevisiae* → *S. baianus*

Como as leveduras nativas têm uma capacidade fermentativa muito inferior à da *S. cerevisiae*, são típicas as fermentações sequenciais começando com as leveduras não-*Saccharomyces* (Jolly *et al.*, 2014). Usando estas leveduras é possível influenciar o teor de ácido acético do vinho, de estéres, a atividade antimicrobiana, a rapidez e produtividade em etanol durante a fermentação e teor de diversos compostos voláteis (Capozzi *et al.*, 2015).

Dos microrganismos de degradação, *Dekkera/Brettanomyces* é considerada uma das espécies mais perigosas mas pouco frequente, sendo a sua principal incidência nos vinhos tintos envelhecidos em barris de carvalho (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Esta origina defeitos aromáticos associados a “couro”, “suor de cavalo” e “tinta”, provenientes da libertação de 4-etilfenol (Fugelsang & Edwards, 2007). Uma das particularidades destes microrganismos é a sua taxonomia: a distinção entre *Dekkera* e *Brettanomyces* está na capacidade de formação de esporos, sendo a *Dekkera* esporolativa e *Brettanomyces* corresponde ao anamorfo (Steensels *et al.*, 2015).

Saccharomyces ludwidgei é considerada “o pesadelo dos produtores de vinho” devido à sua elevada resistência ao SO₂, contudo o seu aparecimento raramente é reportado. Quando presente, causa a formação de sedimentos e/ou turbidez e de elevadas concentrações de acetaldeído (Fugelsang & Edwards, 2007).

Além deste, *Z. bailli* também é considerado uma das espécies mais preocupantes por vários autores, sendo o maior problema a sua capacidade de produzir elevadas concentrações de ácido acético, especialmente em vinhos doces e gaseificados, aliada à turbidez indesejada no produto engarrafado (Jolly *et al.*, 2014). O principal problema desta espécie é a sua tolerância ao etanol, ao SO₂ e à maioria dos conservantes utilizados, além da capacidade de crescer a temperaturas baixas, sendo apenas uma célula viável o suficiente para degradar uma garrafa de vinho (Fugelsang & Edwards, 2007).

Os ácidos málico e tartárico são os ácidos orgânicos predominantes no mosto. As bactérias ácidas lácticas são problemáticas pois não só realizam a fermentação malolática (conversão do ácido L-málico em ácido L-lático e dióxido de carbono), como são capazes de metabolizar pequenas concentrações de citrato em piruvato, lactato, acetato, etanol e diacetil (que em excesso origina aromas a manteiga rançosa) (Horsey, 2007).

Identificação dos microrganismos

O meio Wallerstein Laboratory Nutrient (WL) Agar, é um meio não seletivo no qual a maioria das espécies envolvidas no processo de produção do vinho podem ser distinguidas a partir de quatro dias de incubação, tendo por base a cor, morfologia e tempo de incubação necessário das colónias. Na Tabela 3 estão resumidas essas informações.

Tabela 3. Descrição das colónias no meio WL, adaptado de (Cavazza *et al.*, 1992)

Espécie	Coloração	Morfologia da colónia
<i>Saccharomyces</i>	Creme a esverdeada	Umbiculada, superfície lisa, opaca, consistência cremosa
<i>Torulaspota</i>	Creme, pode ser esverdeada	Umbiculada, superfície lisa, opaca, consistência cremosa
<i>Hanseniaspora</i>	Verde intenso	Plana, superfície lisa, opaca, consistência cremosa
<i>Candida stelatta</i>	Verde ervilha, o centro torna-se escuro	Convexa, superfície lisa, consistência cremosa
<i>Saccharomycodes</i>	Verde	Convexa, superfície lisa, opaca, consistência cremosa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Verde intenso	Puntiforme, perfeitamente redonda, opaca, com consistência amanteigada
<i>Rhodotorula</i>	Rosa	Convexa, superfície lisa, mucosa, com consistência amanteigada
<i>Metschnikowia</i>	Creme, vermelho-acastanhado no fundo	Tamanho pequeno, convexa, consistência farinhenta
<i>Pichia membranifaciens</i>	Cinza-esverdeado	Elevada e convexa, superfície enrugada, consistência farinhenta
<i>Pichia anomala</i>	Creme a azulada, azul ao fim de 8 dias	Plana, superfície lisa, consistência cremosa
<i>Dekkera</i> / <i>Brettanomyces</i>	Creme, só aparece ao fim de 8 dias	Pequena, elevada em cúpula, superfície lisa, consistência cremosa
<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	Creme	Pequena, elevada em cúpula, superfície lisa, consistência cremosa

Algumas espécies produzem colónias com morfologia e cor muito semelhantes, pelo que pode ser necessário recorrer a estratégias complementares. Das espécies citadas, apenas *Saccharomyces* não cresce no meio Agar Lisina, enquanto que no meio WL Diferencial apenas crescem *Brettanomyces* e *Hanseniaspora*. No meio WL é, ainda, possível o crescimento de bactérias ácidas acéticas (colónias puntiformes de pequenas dimensões e coloração verde extremamente intensa e brilhante) e ácidas lácticas, que apenas se manifestam passados dez dias com colónias puntiformes e translúcidas. No caso das bactérias, o meio não é recomendado para a sua contagem (Cavazza *et al.*, 1992).

2.3 Métodos de conservação do mosto e vinho

2.3.1 O dióxido de enxofre

Desde o século XVIII que a utilização de dióxido de enxofre como conservante é uma prática comum, tendo chegado à vinicultura no início do século XX. Mesmo nos raros casos em que o composto não é adicionado intencionalmente, os microrganismos produzem 10 mg L^{-1} a 30 mg L^{-1} durante a etapa de fermentação, pelo que encontrar um vinho totalmente livre de sulfitos é praticamente impossível. O composto tem como principais propriedades o efeito antisséptico, antioxidante e, ao ligar-se a produtos voláteis, consegue proteger os aromas do vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Este método de controlo microbiano pode ser aplicado antes da fermentação, de forma a permitir a conservação do mosto, ou após, evitando a degradação do vinho por ação dos microrganismos (Zuehlke *et al.*, 2013).

O composto pode estar presente livremente na forma molecular (SO_2), na forma de ião bissulfito (HSO_3^-) e ião sulfito (SO_3^{2-}). O equilíbrio entre as formas é definido pelo pH do meio: quanto mais ácida a solução, maior a percentagem da forma molecular. Na gama de valores comuns para o vinho, com pH entre os 3 e os 4, o ião bissulfito corresponde a 95 % a 99 % do SO_2 no meio. Ainda é possível encontrar SO_2 na forma combinada, mas com efeito antisséptico insignificante. De todas as formas, a molecular é a que apresenta maior capacidade antimicrobiana, mas concentrações elevadas levam a alterações indesejadas no aroma e sabor do vinho. Por outro lado, o ião bissulfito ainda apresenta alguma atividade, mas sem alteração do aroma. O único composto sem influência nas propriedades organoléticas é o ião sulfito, mas a sua atividade é quase nula (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Além da dificuldade em calcular com precisão a dose necessária de SO_2 para inibir os microrganismos sem induzir defeitos organoléticos, é necessário ter em atenção que durante o armazenamento a sua concentração vai diminuindo por reações de oxidação. O Regulamento (CE) 606/2009 da Comissão, de 10 de julho, estabelece como limite legal, no momento da colocação do produto no mercado para consumo humano direto, um teor total de SO_2 igual ou inferior a 200 mg L^{-1} para vinhos brancos, podendo atingir os 250 mg L^{-1} se o teor de açúcares (glucose e frutose) for superior a 5 g L^{-1} .

De acordo com o Regulamento (CE) 1907/2006 o SO₂ é considerado um composto tóxico por inalação e corrosivo, podendo causar queimaduras e lesões oculares, sendo recomendado o uso de luvas, bata e óculos de proteção durante o seu manuseamento. Uma vez que não é possível negar que os valores atingidos no vinho são passíveis de produzir efeitos nos consumidores, há tendência para que os limites legais sejam reconsiderados (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Deve-se ainda ressaltar que a presença de SO₂ no vinho induz um estado de sobrevivência (conhecido por Viable But Non Culturable - VBNC), no qual as células apresentam atividade metabólica, mas são incapazes de crescer em meio de cultura. Quando a fonte de stress é removida do meio, as células voltam a crescer. Esse efeito foi descrito em *S. cerevisiae*, *Candida stellata*, *Z. bailli* e *B. bruxellensis* (Divol *et al.*, 2012).

Quando o SO₂ é aplicado ao mosto, é necessário efetuar a sua remoção antes da etapa fermentativa para que os microrganismos alvo inoculados na solução se possam desenvolver. Para tal é possível usar várias técnicas, de entre as quais se destaca a inoculação com uma estirpe sacrificial, cujo único objetivo é ligar-se ao SO₂ livre no meio, reduzindo assim a sua capacidade de operação ou o uso de processos térmicos/físicos, baseados na destilação. O método de remoção utilizado em ensaios laboratoriais é o de adição do peróxido de hidrogénio, uma vez que apresenta custos moderados e não influencia exageradamente as características finais do produto (Zhang *et al.*, 2013). No entanto, de acordo com o Regulamento CE 606/2009, de 10 de julho, apenas é permitida a remoção do dióxido de enxofre por processos físicos em uvas, mosto de uvas e vinho ainda em fermentação. Assim, é bastante comum a remoção por ação térmica, aquecendo o mosto sulfitado a 120 °C numa coluna de destilação fracionada, de modo a que a fração volátil (contendo o SO₂) seja removida. Este vapor contendo o ácido sulfuroso resultante da reação entre o dióxido de enxofre e o vapor de água é, de seguida, neutralizado recorrendo a uma solução de óxido de cálcio.

Devido à sua complexidade nas interações com o vinho e os seus consumidores, as alternativas ao SO₂ têm sido estudadas. Para se encontrar um concorrente direto, é necessário que as propriedades antioxidantes e antimicrobianas sejam semelhantes, não cause interferência na saúde e não influencie as propriedades sensoriais do vinho. No entanto, uma vez que ainda não foram criados métodos *standard* para essas técnicas, não é possível uma comparação direta dos resultados (Cantos-Villar & Guerrero, 2015).

2.3.2 Métodos alternativos

Além do SO₂, é frequente a filtração do vinho produzido e são de uso moderado a aplicação de ozono para esterilização das adegas e o dimetildicarbonato (DMDC) na etapa de engarrafamento, além de várias técnicas emergentes (Zuehlke *et al.*, 2013).

A utilização de DMDC nos vinhos apenas foi aprovada no fim de 2005, pelo regulamento CE nº 2165 de 20 de dezembro, mas o seu uso como antisséptico já era comum na indústria alimentar. Este composto inativa leveduras e alguns fungos e bactérias por ação enzimática, devido à sua reatividade com as proteínas, e pode ter igualmente uma ação sinérgica com o anidrido sulfuroso, mas o seu efeito esterilizante tem a duração de apenas algumas horas, razão pela qual só é recomendada a sua utilização na etapa de engarrafamento (Grazietti, 2006). A sua maior desvantagem, além do curto período de ação e do seu elevado custo, é o facto de hidrolisar dando origem a metanol. Devido à variada tolerância dos microrganismos para o composto, é possível favorecer o crescimento de certas espécies na fase iniciais da fermentação, garantindo que a levedura alvo domina os seus competidores naturais. Como a sua duração é reduzida, não precisa de ser removido e não influencia as etapas seguintes do processo (Escott *et al.*, 2017).

Outra corrente de investigação que tem ganho destaque recentemente é o uso de compostos naturais como o quitosano. A tecnologia é recente e em vários estudos foi possível inibir totalmente o crescimento de alguns microrganismos de decomposição, bem como aumentar a fase de latência de outros. No entanto, estes compostos têm como principais desvantagens a fraca solubilidade em água, elevada suscetibilidade à oxidação e impacto negativo nos atributos sensoriais do produto (Escott *et al.*, 2017).

Os tratamentos térmicos têm eficácia comprovada, mas a sua implementação na indústria dos vinhos não atinge a grande escala por razões operacionais: apesar da facilidade em alcançar condições de operação que permitam diminuir a carga microbiana, a logística de implementação do equipamento numa adega, torna difícil garantir condições estéreis durante todo o processamento, uma vez que é necessário que todos os materiais que contactam com o produto estejam, também eles, estéreis (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). Além disso, dependendo do produto, as características organolépticas podem ser afetadas devido às altas temperaturas de operação (Escott *et al.*, 2017).

A inativação térmica é caracterizada por dois parâmetros: i) valor do tempo de redução decimal (*D*), que representa a duração necessária do tratamento, a uma temperatura

específica, para obter uma redução de 90 % da população microbiana; e ii) a variação de temperatura necessária para diminuir 10 vezes o valor de $D(z)$. O parâmetro D depende do microrganismo, das condições de cultura e de aquecimento enquanto que o valor de z depende apenas do microrganismo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Na Tabela 4 são apresentados os parâmetros de morte térmica conhecidos para alguns dos microrganismos de degradação do vinho.

Tabela 4. Valores da cinética de morte térmica para alguns dos microrganismos de degradação do vinho

Microrganismo	$T / ^\circ\text{C}$	D / min	$z / ^\circ\text{C}$	Amostra	Meio de Cultura
<i>Dekkera anomala</i> PYCC 5153	45.0	33.3 a 48.5 ^α	4.3 a 4.5 ^α	Buffer tartarato (pH 4.0)	YM agar (Couto <i>et al.</i> , 2005)
	50.0	2.0 a 2.4 ^α			
	52.5	0.6 a 0.9 ^α			
	55.0	0.2			
<i>Dekkera bruxellensis</i> PYCC 4801	45.0	6.0 a 17.4 ^α	4.4 a 5.8 ^α		
	50.0	3.4 a 3.8 ^α			
	52.5	1.0 a 1.1 ^α			
	55.0	0.3 a 0.4 ^α			
<i>Dekkera/Brettanomyces</i> 093	45.0	7.5 a 17.6 ^α	5.5 a 5.7 ^α		
	50.0	2.7 a 4.8 ^α			
	52.5	0.7 a 1.0 ^α			
	55.0	0.3			
<i>Dekkera anomala</i> PYCC 5153	32.5	7.9 a 8.9 ^β	3.7 a 4.5 ^β	Vinho Tinto	
	35.0	1.4 a 4.0 ^β			
	37.5	0.4 a 0.6 ^β			
<i>Dekkera bruxellensis</i> PYCC 4801	32.5	14.8 a 23.3 ^β	3.3 a 4.3 ^β		
	35.0	2.1 a 2.3 ^β			
	37.5	0.7 a 1.0 ^β			
<i>Dekkera/Brettanomyces</i> 093	32.5	14.4 a 16.6 ^β	3.8 a 4.2 ^β		
	35.0	2.2 a 4.6 ^β			
	37.5	0.8 a 0.9 ^β			
<i>Dekkera bruxellensis</i> CBS 2499	55.0	1.3	9.8	Água Deonizada	WL agar (Fabrizio <i>et al.</i> , 2015)
	57.5	0.7			
	60.0	0.3			
	62.5	0.2			
<i>Dekkera bruxellensis</i> CBS 2797	55.0	1.1	10.2		
	57.5	0.8			
	60.0	0.3			
	62.5	0.2			
<i>Dekkera bruxellensis</i> CBS 4459	55.0	1.1	9.2		
	57.5	0.7			
	60.0	0.3			
	62.5	0.2			
<i>Dekkera bruxellensis</i> CBS 4601	55.0	1.3	9.8		
	57.5	0.7			
	60.0	0.3			
	62.5	0.2			

Tabela 4. Valores da cinética de morte térmica para alguns dos microrganismos de degradação do vinho
(continuação)

Microrganismo	$T / ^\circ\text{C}$	D / min	$z / ^\circ\text{C}$	Amostra	Meio de Cultura
<i>Saccharomyces ludwigii</i> ISA 1108	34.0	25.0	5.9	Vinho Tinto	GYP (Morais, 2012)
	36.0	20.0			
	38.0	7.1			
	40.0	2.6			
<i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 2211	30.0	20.8	7.3		
	32.0	15.2			
	34.0	7.8			
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 2270	36.0	3.1	17.5		
	34.0	13.0			
	36.0	11.1			
	38.0	7.7			
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	40.0	9.7	3.2	Vinho	Não específica (Deveze & Ribereau-Gayon, 1977)
	35.5	250.0			
	37.0	105.6			
	38.5	31.0			
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	40.0	10.6	4.3		
	37.5	155.3			
	39.0	89.5			
	40.5	41.6			
	42.0	13.4			

Nos casos em que é apresentado um intervalo, este corresponde a microrganismos em diferentes fases de crescimento (α) ou à utilização de vinhos com diferentes características físico-químicas (β).

Na tentativa de evitar compostos químicos e os efeitos negativos associados ao processamento térmico por longos períodos, os tratamentos baseados em campos elétricos surgem como uma opção. Este tipo de processamento é particularmente interessante devido à versatilidade de operação, facilidade de aumento de escala, efeito de eletroporação membranar e eficiência energética (Santos & Rodrigues, 2018). Estas tecnologias podem ser operadas em forma de pulso, como os Campos Elétricos Pulsados (PEF), Aquecimento Óhmico Pulsado (POH) e Descargas Elétricas de Alta Voltagem (HVED), ou em modo contínuo, como o Aquecimento Óhmico (OH), Campos Elétricos Moderados (MEF) e Eletrofiltração.

Apesar dos PEF serem a técnica mais referenciada na literatura para fins de inativação não térmica, as condições operacionais menos exigentes dos MEF, associadas à facilidade de implementação da tecnologia fazem com que estes sejam mais atraentes, razão pela qual a sua investigação tem aumentado exponencialmente nos últimos anos. Das técnicas não pulsadas, o OH é a mais relevante no que toca a aplicações industriais e

disponibilidade comercial como alternativa à pasteurização comercial, tendo ganho relevância na valorização de biorrecursos (Santos & Rodrigues, 2018).

2.3.3 Aquecimento Ôhmico

Durante o processo de aquecimento existe uma conversão quase total de energia elétrica em energia térmica (> 95 % de eficiência), com as taxas de aquecimento a variar consoante o *design* do reator, condições de tratamento e as propriedades intrínsecas do produto (condutividade, viscosidade e calor específico). Este fenómeno obedece à lei de Ohm e é caracterizado pelos curtos tempos de operação e aquecimento volumétrico. O processo de aquecimento pode ser atingido com recurso a corrente elétrica direta ou alternada, sendo a última a mais utilizada pois permite prevenir reações eletroquímicas indesejadas, que, entre outras coisas, originam a corrosão dos elétrodos. Pela mesma razão, são aconselháveis as frequências elétricas de operação superiores a 20 kHz, de forma a reduzir a erosão dos elétrodos por inibição das reações de Faraday (Jaeger *et al.*, 2016; Pataro *et al.*, 2014). Comparando as operações contínua e em pulso, a última permite reduzir as taxas de corrosão dos elétrodos, tanto para elétrodos de aço inoxidável como para titânio e mistura de titânio e platina, sendo que o oposto foi observado para elétrodos de grafite (Samaranayake *et al.*, 2005).

Os componentes maioritários de uma instalação de Aquecimento Ôhmico operando em descontínuo, representados na Figura 8, são os elétrodos, o reator no qual são colocadas as amostras a tratar, a fonte de corrente elétrica, uma unidade de controlo da voltagem aplicada, termopares e um sistema de aquisição de dados (Kaur & Singh, 2016).

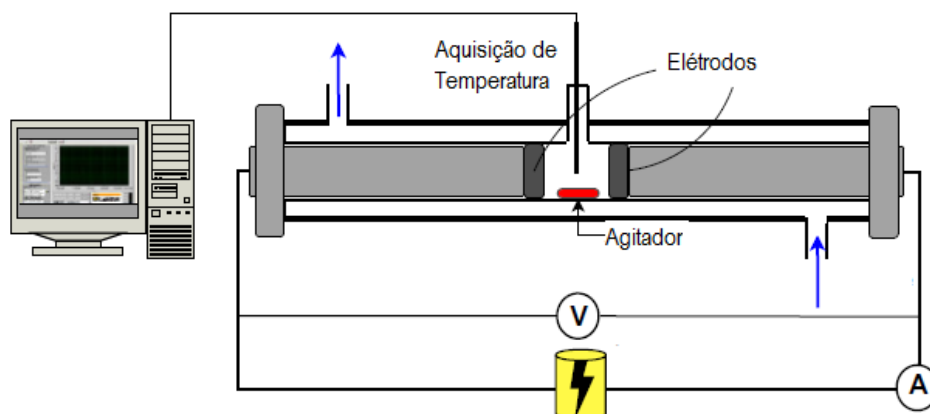


Figura 8. Esquema dos componentes, adaptado de (Machado *et al.*, 2010).

Relativamente aos restantes processos de aquecimento, os sistemas de Aquecimento Óhmico apresentam-se como uma alternativa de relevo, principalmente para aplicações em matrizes particuladas e de elevada viscosidade. As vantagens mais relevantes deste tipo de processos são a capacidade de tratar sólidos e líquidos de forma rápida e uniforme e sem perda de nutrientes, a redução do efeito de *fouling*, a simplicidade do controlo do processo, os reduzidos custos de manutenção e o facto de ser uma tecnologia amiga do ambiente (por exemplo reduz a utilização de caldeiras e energia fóssil, água ou vapor de água e a energia eléctrica pode ser proveniente de uma fonte renovável). No entanto, o processo apresenta duas grandes desvantagens: o elevado custo inicial de instalação e operação e a falta de casos de estudo que permitam validar a tecnologia (Teixeira *et al.*, 2012).

Parâmetros a monitorizar e controlar

O parâmetro crucial no que diz respeito à modelação do Aquecimento Óhmico é a condutividade eléctrica (σ), uma vez que o seu valor determina a possibilidade de aplicação da tecnologia, assim como reflete mudanças na estrutura da matriz, processos de gelatinização ou lise celular, entre outros. Este parâmetro é dependente da temperatura (aumenta linearmente com o aumento desta), do conteúdo iónico da amostra e da frequência de operação. Quando está presente mais do que uma fase, a concentração e tamanho das partículas pode influenciar a condutividade eléctrica efetiva da mistura, e a sua orientação e geometria podem influenciar a taxa de aquecimento dos diferentes constituintes da amostra. Estas condições podem levar a uma baixa uniformidade do aquecimento, com a presença de zonas mais frias, levando à diminuição da eficácia global do processo (Teixeira *et al.*, 2012).

Casos de estudo na indústria alimentar

No caso de alguns alimentos, como a geleia de fruta e leite, Pereira *et al.* avaliaram os efeitos dos tratamentos nas propriedades dos produtos. As amostras foram aquecidas no reator óhmico, recorrendo a voltagens entre os 40 V e 240 V e intensidade de corrente entre os 1 A e 10 A, além de serem aquecidas em permutadores de calor de forma convencional como comparação. Os resultados das análises de caracterização permitiram

concluir que os produtos obtidos por processamento ôhmico possuem propriedades semelhantes aos obtidos por métodos convencionais (Pereira *et al.*, 2007).

Vários estudos têm sido realizados para avaliar o efeito do OH na atividade enzimática, devido à sua elevada relevância na indústria alimentar: são usados enzimas para melhorar parâmetros organoléticos dos alimentos (textura e sabor), aumentar a eficácia da extração de compostos e recuperação de subprodutos, mas podem ter efeitos indesejáveis como a produção de odores, alterar texturas e sabores (Teixeira *et al.*, 2012).

Castro *et al.* testaram a atividade enzimática da lipoxigenase (LOX) originária da soja, polifenoloxidase (PPO) proveniente de maçãs, pectinase (PEC), fosfatase alcalina (ALP) originária do leite cru e β -galactosidase (B-GAL) do caldo fermentativo. Para todos os enzimas avaliaram os parâmetros de degradação térmica, comparando o aquecimento convencional com o ôhmico, configurado para operar com corrente alternada a uma frequência de 50 Hz, e campo elétrico variável (nunca superior a 90 V cm^{-1}), simulando o perfil de aquecimento térmico convencional e avaliando efeitos do campo elétrico na inativação. Com esse estudo ficou demonstrado que para a PPO e LOX o tempo necessário para obter a mesma inativação é mais curto (reduzido em até 5 vezes) quando está presente o campo elétrico, diminuindo assim os efeitos secundários indesejados do processo, como a destruição térmica de vitaminas e pigmentos; foi igualmente observado que nos restantes enzimas estudados, a atividade não parece ser influenciada pelo campo elétrico (Castro *et al.*, 2004).

Várias matrizes alimentares já foram analisadas, desde vegetais e frutos, sumos de fruta, carne/peixe, avaliando os efeitos da desintegração celular, esterilização, pasteurização, branqueamento e aquecimento/descongelamento, realçando a ampla gama de possibilidades de aplicação da tecnologia na indústria alimentar.

Efeito do campo elétrico na inativação não-térmica de microrganismos

Além da possibilidade de operar a altas temperaturas, simulando a pasteurização, a operação a temperaturas moderadas aliada a campos elétricos moderado têm permitido efeitos de inativação microbiológica.

Machado *et al.* avaliaram a cinética de morte de *Escherichia coli* recorrendo à aplicação de MEF por períodos entre os 2.5 min e 20 min, a temperaturas sempre

inferiores a 25 °C e campos elétricos entre os 50 V cm⁻¹ e 280 V cm⁻¹. Quando avaliadas ao microscópio todas as células tratadas apresentavam alterações na membrana. Além disso, constataram que campos superiores a 220 V cm⁻¹ permitem reduzir a carga microbiana em 3 ciclos logarítmicos, em menos de 6 min (Machado *et al.*, 2010).

Cho *et al.* monitorizaram o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* em meio de Man, Rogosa e Sharp (MRS), assim como a sua capacidade fermentativa utilizando fermentadores equipados com aquecimento convencional e ôhmico, mantendo o meio a três temperaturas diferentes (30 °C, 35 °C e 45 °C). No caso das experiências com campo elétrico, foi usada uma corrente alternada a 60 Hz em conjunto com voltagens constantes de 15 V e 40 V. Para a temperatura mais baixa, verificaram que a fase de latência era dezoito vezes superior no caso do aquecimento convencional, quando comparado com o OH, sendo essas diferenças insignificantes no caso das temperaturas mais elevadas. O meio aquecido na presença de corrente elétrica apresentou, ainda, um pH significativamente superior no final da fermentação (Cho *et al.*, 1996).

Pereira *et al.* estudaram a influência do campo elétrico nos parâmetros da cinética de morte de *E. coli* presente no leite de cabra e esporos de *Bacillus licheniformis* na compota de amora silvestre, recorrendo a um reator ôhmico a operar com corrente alternada e a uma frequência de 50 Hz, controlando a voltagem aplicada de modo a manter um perfil de temperatura semelhante ao aquecimento convencional (o campo elétrico foi a única variável diferente entre os dois tratamentos). Para impedir reações químicas indesejadas que pudessem influenciar os resultados, foram usados eletrodos de titânio platinizados. Para temperaturas entre 60 °C e 75 °C Pereira *et al.* observaram que o tempo necessário para a obter a mesma inativação de *E. coli* foi significativamente reduzido quando se aplicava a corrente elétrica, sendo que para a temperatura de 55 °C (temperatura próxima da ótima para o crescimento) ocorreu o inverso. Na inativação de esporos de *B. licheniformis*, para temperaturas entre 70 °C e 90 °C, a presença do campo elétrico permitiu inativar os microrganismos mais rapidamente (Pereira *et al.*, 2007).

Já em 1992, Palaniappan *et al.* tinham observado que, apesar de não haver uma diferença na cinética de inativação dos microrganismos, a aplicação de campos elétricos em condições não letais reduzia a intensidade do tratamento térmico necessário de seguida para a sua inativação. Posteriormente, vários autores observaram efeito

semelhante ao descrito nos parágrafos anteriores para *Streptococcus thermophilus* e *Byssochlamys fulva* (Kaur & Singh, 2016).

Tendo em conta a necessidade de tratamentos alternativos do mosto, evitando a utilização de produtos químicos, e sabendo que atualmente a tecnologia de aquecimento óhmico reúne potencial de inativação térmico e não térmico, surgiu este estudo, cujo principal objetivo é avaliar a influência da aplicação de campos elétricos moderados na inativação dos microrganismos de degradação do mosto. Para tal, foram realizados os procedimentos descritos no capítulo 3, sendo os seus resultados apresentados no capítulo 4.

3. METODOLOGIAS

Este capítulo encontra-se dividido em três secções principais: secção 3.1 referente às metodologias empregues para a caracterização física e química do mosto; secção 3.2 de análise microbiológica; e secção 3.3 relativa aos ensaios de inativação realizados por OH. Os métodos publicados pela OIV foram seguidos sempre que possível.

A análise dos resultados foi efetuada com recurso ao *software* Statistica™, considerando um intervalo de confiança de 95 %. Para comparação de apenas dois grupos de dados optou-se pelo Teste t-Student, enquanto que a análise de variâncias ANOVA foi a opção selecionada para comparar várias médias experimentais. Amostras cujos parâmetros apresentam diferenças significativas entre si ($p < 0.05$) são representadas por letras diferentes junto desses mesmos dados.

3.1 Caracterização física e química do mosto

As amostras de mosto foram submetidas à determinação dos Sólidos Solúveis Totais (*SST*), pH, teor proteico (*TP*), acidez titulável (*AT*) e concentração de açúcares redutores (*AR*). Em algumas amostras foi, ainda, realizada a medição do oxigénio dissolvido.

O teor em *SST* foi determinado usando o refratómetro digital HI 96801 (Hanna Instruments, Itália), calibrado e limpo com água destilada entre cada medição, de acordo com o método OIV-MA-AS2-02.

O pH das amostras foi medido recorrendo ao potenciómetro digital equipado com eletrodo de vidro (HI 2210, Hanna Instruments, Itália), calibrado com soluções padrão de pH 4, 7 e 9 (Silva *et al.*, 2015).

O método do DNS foi usado para a quantificação dos *AR*, tendo sido elaborada uma curva de calibração com concentrações de glucose entre 1 g L⁻¹ e 12.5 g L⁻¹ resultando numa reta de calibração descrita na Equação 2, com coeficiente de correlação de 0.9971. A 0.5 mL de mosto foram adicionados 0.5 mL de solução DNS e a mistura foi colocada em banho de água a 100 °C por 5 min, arrefecendo-se de seguida com 5 mL de água fria. A absorvância a 540 nm das amostras foi lida e convertida em *AR* (Chavarria *et al.*, 2008).

$$\frac{AR}{g L^{-1}} = \frac{Abs_{540 nm} - 0.0913}{0.2421} \quad \text{Equação 2}$$

O *TP* das amostras foi quantificado recorrendo ao Kit Coomassie (Bradford) Protein Assay (Thermo Fischer Scientific TM, Estados Unidos da América). Foram seguidas as instruções do vendedor, usando o protocolo B para microplaca e determinada uma curva de calibração entre 1 mg L⁻¹ e 25 mg L⁻¹, representada na Equação 3, com coeficiente de correlação de 0.9859. Foram adicionados 150 µL de reagente de Coomassie a 150 µL de mosto, incubando-se a temperatura ambiente por 10 min. A absorvância a 595 nm das amostras foi lida e convertida em concentração de proteína pela Equação 3.

$$\frac{TP}{\text{mg L}^{-1}} = \frac{\text{Abs}_{595\text{ nm}} - 0.0641}{0.2222} \quad \text{Equação 3}$$

A *AT* determinou-se titulando uma mistura de 10 mL de mosto, 30 mL de água destilada e 1 mL de solução indicadora de azul de bromotimol com uma solução de NaOH 0.1 mol L⁻¹, sob agitação, até à obtenção da coloração azul-verde. O indicador foi preparado dissolvendo 10 mg de azul de bromotimol em 10 mL de etanol 96 % e adicionando 10 mL de água destilada depois de totalmente dissolvido. Os resultados foram expressos em gramas de ácido tartárico por litro de acordo com o método OIV-MA-AS313-01. A Equação 4 representa a relação entre o volume de titulante gasto (*V*_{NaOH}) e a *AT* do mosto.

$$\frac{AT}{\text{g L}^{-1}} = V_{NaOH} \times 10 \times 0.075 \quad \text{Equação 4}$$

A medição do oxigénio dissolvido nas amostras, recorrendo a uma sonda Oxygen 4100 Transmitter (Mettler Toledo, Estados Unidos da América), que permite a quantificação direta da grandeza. Para tal, as amostras foram primeiro mantidas à temperatura ambiente até se encontrarem em equilíbrio térmico com o meio.

Para a realização da monitorização da temperatura ambiente, recorreu-se ao ibutton DS2422 (Maxim Integrated TM, Estados Unidos da América).

3.2 Microbiologia

Para todos os ensaios microbiológicos o trabalho prático foi efetuado em condições assépticas, operando quando possível em câmara de fluxo laminar, e todo o material e soluções foram esterilizados no autoclave ou, na impossibilidade do seu uso, filtrados com membrana de 22 µm.

Preparação de meios de cultura

Para a caracterização das espécies presentes no mosto recorreu-se ao meio WL, cuja composição detalhada é apresentada no Anexo I, enquanto que para a obtenção de *stocks* de *Dekkera bruxellensis* se recorreu ao meio YPD, composto por 20 g L⁻¹ de glucose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura e 20 g L⁻¹ de peptona e, no caso do meio sólido, 15 g L⁻¹ de agar.

A preparação de todos os meios foi idêntica, obedecendo ao método OIV-MA-AS4-01. Os componentes secos foram pesados e foi adicionada água destilada de modo a obter a concentração final desejada. Depois de submetido a agitação até à completa dissolução, o meio foi autoclavado durante 20 min a 121 °C. Os meios contendo agar foram subsequentemente vertidos para placas de Petri de 96 mm de diâmetro.

Caraterização da microbiologia das amostras

Também de acordo com o método OIV-MA-AS4-01, as amostras de mosto foram diluídas em diluições sequenciais de dez vezes. Cada placa de meio WL foi inoculada com 0.1 mL da amostra diluída e espalhada, em condições asséticas, até à completa absorção do líquido. As placas foram incubadas invertidas a 25 °C durante 4 dias para contagem de colónias e 8 dias para diferenciação das espécies.

A concentração de microrganismos (CM), representada em UFC mL⁻¹, foi calculada de acordo com a Equação 5, com base nas colónias presentes em cada placa (n) e no volume plaqueado (vol), em mililitros, multiplicado pelo respetivo fator de diluição (f).

$$\frac{CM}{\text{UFC mL}^{-1}} = n \times \frac{\text{mL}}{vol} \times f \quad \text{Equação 5}$$

Com os dados das amostras tratadas e não tratadas, calculou-se a percentagem de inativação conseguida em cada tratamento, descrita na Equação 6, em que c e t correspondem às amostras do controlo e às tratadas, respetivamente.

$$\% \text{ inativação} = \frac{(CM)_c - (CM)_t}{(CM)_c} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Em alguns casos foi estudado o crescimento ao longo do tempo das amostras. Para tal, as amostras foram colocadas em matrizes autoclavados, mantendo sempre 50 % do

volume do matraz ocupado, e colocadas a incubar a 25 °C com agitação a 120 rpm. Em intervalos de tempo definidos, foram recolhidas alíquotas para eppendorfs e o seu crescimento microbiano foi avaliado diretamente, por: i) contagem de colónias em meio WL; ii) contagem celular em câmara de Neubauer; e iii) indiretamente pela absorvância a 650 nm. Na Figura 9 está representado um exemplo dos matrizes usados (matraz de 100 mL contendo 50 mL de meio YPD para crescimento de levedura).

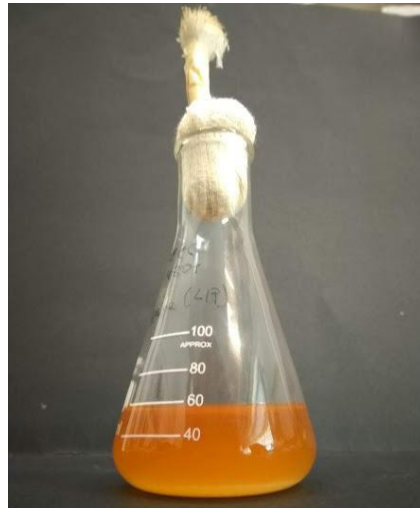


Figura 9. Matraz usado para monitorização do crescimento ao longo do tempo.

Para as contagens celulares foi usada uma câmara de Neubauer como a apresentada na Figura 10, que possui duas câmaras individuais para contagem (0640010, Marienfeld Superior, Alemanha).



Figura 10. Câmara de Neubauer para contagem celular.

Depois de colocada a lamela, pipetaram-se 10 μ L de amostra para cada uma das câmaras de contagem e, recorrendo à ótica Plan 40X/0.65 do microscópio H550S (Nikon, Japão), foram contadas as células visíveis nos quatro quadrados terminais e no quadrado central da secção central da câmara, como realçado a verde na Figura 11. Quando necessário, as amostras foram diluídas de forma a manter o número total de células

contadas nos cinco quadrados entre 200 e 500. As leveduras em processo de reprodução foram consideradas como uma única unidade, sempre que as células-filha apresentaram um tamanho inferior a 50 % do tamanho da célula mãe.

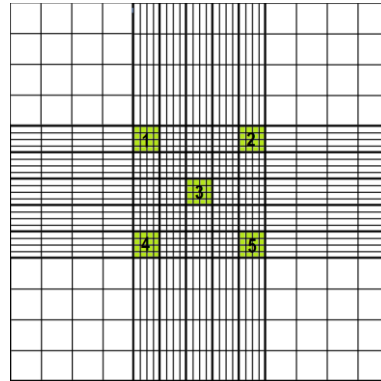


Figura 11. Esquema dos quadrados usados para contagem de células.

Sabendo o volume associado a cada um dos quadrados representados a verde, a média das contagens efetuadas nesses cinco quadrados (\bar{c}) e o fator de diluição (f), é possível calcular a concentração celular de acordo com a Equação 7.

$$\text{células mL}^{-1} = \frac{\bar{c}}{6.25 \times 10^{-5}} \times f \quad \text{Equação 7}$$

Com estes dados, recorrendo ao pacote Growthcurver do *software* R foram calculados os parâmetros específicos de crescimento dos microrganismos.

Preparação de stocks de levedura

Preparou-se um pré-inóculo da levedura PYCC 4801 *Dekkera bruxellensis*, colocando aproximadamente 10 μL de levedura recolhidos com uma ansa em falcons estéreis contendo 10 mL de meio YPD e incubando a 28 °C com agitação de 100 rpm por 48 h. Após este tempo, o pré-inóculo foi transferido para um matraz de 100 mL, contendo 50 mL de meio YPD, e incubado nas mesmas condições por 48 horas. De seguida, as amostras foram plaqueadas em meio YPD sólido e incubadas a 30 °C durante 4 dias.

As colónias foram recolhidas da placa usando uma solução estéril (20 % glicerol, 30 % água ultrapura e 50 % meio YPD) e colocadas em frascos de criopreservação, como os apresentados na Figura 12, para armazenamento a -80 °C (para manutenção a longo prazo) ou -18 °C (para manutenção a curto prazo).



Figura 12. Frascos de criopreservação usados para a manutenção da levedura.

Utilização da levedura alvo

Para os ensaios com a cultura pura da levedura PYCC 4801 procedeu-se, primeiro, à sua inoculação em mosto estéril. Para tal, o mosto foi autoclavado e, recorrendo aos *stocks* produzidos anteriormente, foi inoculada uma cultura com uma concentração final de 1×10^7 UFC mL⁻¹.

Num segundo ensaio, para evitar possíveis contaminações cruzadas devido à utilização do mosto, inoculou-se a levedura PYCC 4801 em meio YPD líquido e incubou-se durante 72 h a 28 °C e 100 rpm. Este inóculo serviu de cultura inicial a adicionar ao meio YPD com condutividade ajustada (por adição de água destilada antes de autoclavar), com o objetivo de simular o mosto.

3.3 Aquecimento Óhmico

Os ensaios no reator óhmico dividem-se em duas componentes: ensaios preliminares e ensaios de inativação com as leveduras do mosto. A instalação experimental está representada na Figura 13, destacando-se o reator tubular com camisa de arrefecimento (no centro da imagem), sobre a placa de agitação. Cada eléctrodo de aço inox colocado nas extremidades do reator tem uma área superficial de 3.8 cm². O espaçamento entre os eléctrodos variou entre 1.5 cm e 2.5 cm, correspondendo a volumes de amostra entre 5 mL e 12 mL.

No gerador de sinal apresentado no lado esquerdo da imagem (33220A, Agilent Technologies Inc., Estados Unidos da América), o tipo de onda selecionado para todos os ensaios foi o sinusoidal e a frequência de operação fixou-se nos 25 kHz, com exceção de

um ensaio no qual a frequência foi de 50 kHz. Recorreu-se a um amplificador de sinal (CS 3000, Peavey Electronics Corporations, Estados Unidos da América), apresentado no lado esquerdo da imagem, de forma a aumentar a voltagem de trabalho. A equação que relaciona a voltagem definida no gerador de sinal (V_{gerador}) com a voltagem efetiva aplicada (V) é apresentada na equação 8:

$$\frac{V}{V} = 0.0343 \times \frac{V_{\text{gerador}}}{\text{mV}} + 0.277 \quad \text{Equação 8}$$

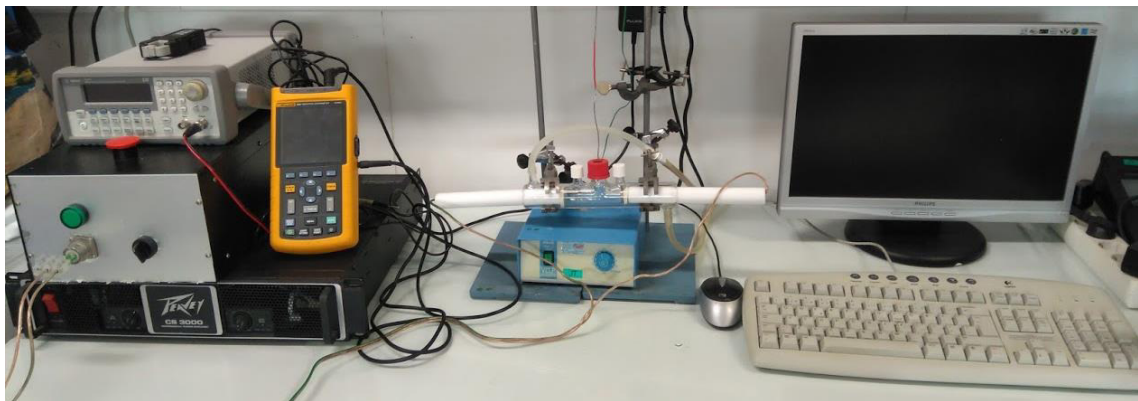


Figura 13. Esquema da instalação experimental.

Para todos os ensaios foram recolhidos os perfis de temperatura ao longo do tempo, recorrendo a um termopar do tipo K, e para cálculo da condutividade, os valores de intensidade do sinal elétrico foram medidos com recurso a um osciloscópio industrial (125, Fluke Corporation, Estados Unidos da América). Os valores instantâneos de condutividade foram adquiridos diretamente através de um condutímetro equipado com um eléctrodo TetraCon 323 (LF 538, WTW Xylem Inc., Estados unidos da América).

Ensaio preliminares de caracterização

Para estimar o perfil de aquecimento do mosto comparou-se a sua condutividade elétrica com a de soluções salinas de concentração conhecida. Para tal, foram preparadas soluções de cloreto de sódio (NaCl) de concentrações 0.5 mol L^{-1} , 0.25 mol L^{-1} , 0.1 mol L^{-1} e 0.025 mol L^{-1} . As amostras foram colocadas no reator, na ausência de banho de arrefecimento, e aquecidas a voltagem constante até $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Procedeu-se da mesma forma com amostras de mosto.

Foram registados os valores de temperatura, voltagem aplicada e intensidade da corrente (I), além do espaçamento entre os elétrodos (d), e a área dos mesmos (A).

A condutividade das várias amostras para cada temperatura, foi calculada de acordo com a Equação 9, que relaciona as várias grandezas medidas experimentalmente.

$$\frac{\sigma}{\text{S cm}^{-1}} = \frac{I}{\frac{A}{V}} \times \frac{d}{\frac{A}{\text{cm}^2}} \quad \text{Equação 9}$$

Representando graficamente os valores de σ em função da temperatura (T) foi obtida, por regressão linear, a equação que permite relacionar as duas grandezas.

Ensaio de inativação

Para os ensaios de inativação em reator óhmico, realizados em triplicado, utilizaram-se amostras de mosto não sulfitado recentemente descongeladas. Em todas as séries de tratamento foi retirada uma amostra não tratada para controlo, que foi processada de forma igual às restantes. As condições operacionais mais relevantes dos ensaios exploratórios de inativação são apresentadas na Tabela 5.

Quando atingida a temperatura alvo, iniciou-se a contagem do tempo de operação (t). Nos ensaios sem campo elétrico, o aquecimento das amostras foi realizado pela circulação de água na camisa do reator, com uma temperatura superior em 5 °C à temperatura alvo. Nos ensaios superiores a 1 s, o campo elétrico aplicado (CE) foi calculado com base na voltagem necessária para manter a amostra a essa temperatura, e não na voltagem necessária para a atingir. Para razões de comparação entre o efeito do campo elétrico e da temperatura, nos ensaios mais longos optou-se por variar a voltagem de forma a simular o perfil de aquecimento convencional, enquanto nos ensaios curtos o objetivo foi potenciar a rapidez do tratamento.

Após o tratamento das amostras, procedeu-se à caracterização microbiológica por plaqueamento em meio WL sólido e pela leitura da absorvância a 650 nm. As amostras foram armazenadas a 4 °C para nova caracterização microbiológica ao fim de 28 dias.

Os resultados que se mostraram mais promissores foram transpostos para ensaios com a levedura alvo, usando meios inoculados com a estirpe PYCC 4801.

Tabela 5. Condições operacionais mais relevantes dos ensaios de inativação

$T / ^\circ\text{C}$	$CE / (\text{V cm}^{-1})$	t
28	1	30 min
28	20	30 min
28	20	1 h
28	30	30 min
40	0	30 min
40	32	30 min
40	90	1 s
45	0	30 min
45	22	30 min
45	70	1 s
45	70	$3 \times 1\text{s}$
50	0	30 min
50	32	30 min
50	90	1 s
65	0	15 min
65	9	30 min
65	22	15 min
65	70	1 s
65	70	$3 \times 1\text{s}$
72.5	0	15 s
72.5	34	15 s
90	0	1 s
90	70	1 s

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização física e química do mosto

Uma das primeiras etapas do trabalho foi a caracterização da matriz alimentar a ser usada durante os ensaios: o mosto de uvas brancas proveniente de várias castas representativas da Região dos Vinhos Verdes.

As amostras de mosto fornecidas para os ensaios laboratoriais foram provenientes de vários dias de colheita e de diferentes lotes, produzidos pela junção de uvas adquiridas a diversos produtores, sendo observável a olho nu diferenças na turbidez e cor das amostras, indicando uma grande variabilidade das características.

Na Figura 14, apresentam-se duas amostras de mosto não tratado, poucas horas depois de ser descongelado, que permitem comprovar essa diferença visual. Os dois falcons da imagem A possuem as amostras depois de agitadas e, nos falcons da imagem B, são apresentadas as mesmas amostras sedimentadas naturalmente.

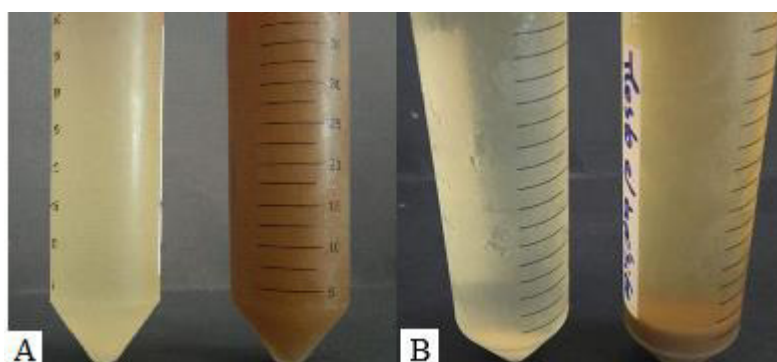


Figura 14. Avaliação visual da variabilidade das amostras de mosto.

Observando a imagem, é possível constatar que as amostras variam não só na cor como também na quantidade de sedimentos que as compõem. Mesmo quando totalmente sedimentadas, uma das amostras apresenta um sobrenadante mais opaco e acastanhado. O facto de as amostras sedimentarem rapidamente foi um dos fatores que mais complicou o processo de amostragem e a homogeneidade ao longo dos vários ensaios.

Para testar se as diferenças visuais se repercutiam nos parâmetros de caracterização seleccionados, os valores de pH, SST, AT, TP e AR foram medidos em três lotes distintos e encontram-se resumidos na Tabela 6. As amostras dos Lotes 1 e 2 apresentavam um

aspecto claro e pouco turvo, tendo sido escolhidas para os ensaios de inativação, enquanto que a amostra do Lote 3, por se tratar de um mosto com um extenso depósito, não foi usada para esse fim, uma vez que a elevada turbidez poderia dificultar a comparação visual direta entre as amostras. Desta forma a amostra foi usada apenas para caracterização microbiológica e ensaios preliminares.

Tabela 6. Valores médios de *AR*, *AT*, pH, *SST* e *TP* para três lotes de mosto

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
<i>AR</i> / (g L ⁻¹)	271.80 ± 26.56 ^a	349.42 ± 20.82 ^b	212.74 ± 38.36 ^a
<i>AT</i> / (g L ⁻¹)	5.00 ± 0.11 ^a	6.39 ± 0.40 ^b	6.85 ± 0.11 ^b
pH	3.27 ± 0.01 ^a	3.25 ± 0.01 ^a	3.36 ± 0.05 ^b
<i>SST</i> / °Brix	21.90 ± 0.00 ^a	20.18 ± 0.13 ^b	18.93 ± 0.06 ^c
<i>TP</i> / (mg L ⁻¹)	35.39 ± 7.51 ^a	20.00 ± 7.34 ^a	122.00 ± 55.41 ^b

Analisando os resultados obtidos, é possível confirmar que os vários lotes de mosto apresentam características diferentes para os vários parâmetros analisados, sendo que, no caso dos *SST*, parâmetro intrinsecamente relacionado com a turbidez, os valores são distintos para todas as amostras.

Apesar das diferenças, os valores encontram-se na gama dos descritos por outros autores para vários tipos de mosto (Chavarria *et al.*, 2008; Flamini & Vedova, 2007).

4.2 Caracterização microbiológica do mosto

Conhecidas as características físico-químicas do mosto, partiu-se para a sua caracterização microbiológica.

Para os diferentes mostos verificou-se o crescimento de colónias dentro dos valores contáveis (entre 10 a 300 colónias) nas placas com amostras diluídas de 1:1, 1:10 e 1:100, tal como recomendado pela OIV. Ao longo dos vários ensaios de inativação foi possível, mais uma vez, observar a diversidade entre as várias amostras: a carga de microrganismos nos mostos acabados de descongelar, usados como controlo, variou entre as 2 000 UFC mL⁻¹ e as 16 000 UFC mL⁻¹.

Com base na coloração e morfologia das colónias no meio WL, bem como o tempo necessário para o seu aparecimento, foi possível a identificação de algumas das espécies

presentes nos mostos (Cavazza *et al.*, 1992). Com esses dados, foi possível analisar as suas interações ao longo do tempo e, novamente, a variabilidade entre as amostras.

Para corroborar os dados, algumas amostras foram plaqueadas em meio WL diferencial (contendo cicloheximida), além do plaqueamento em meio WL não seletivo, de forma a confirmar ou eliminar a presença de *Dekkera/Brettanomyces*, como apresentado na Figura 15.

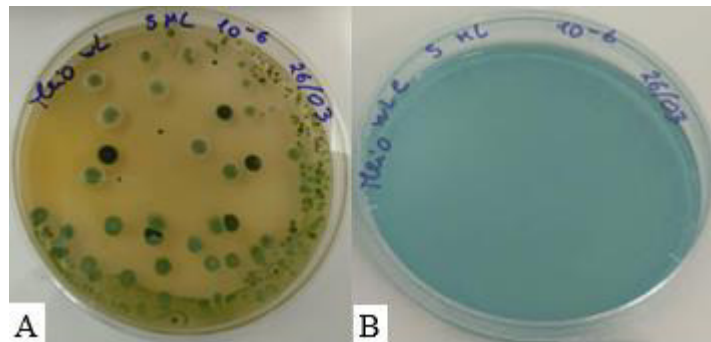


Figura 15. Amostra de mosto em meio WL (A) e WL seletivo (B).

Como é possível observar na Figura 15, mesmo após 14 dias de incubação não são identificáveis nenhuma colónias no meio WL seletivo (imagem B), enquanto que a mesma amostra plaqueada em meio não seletivo (imagem A) apresenta uma considerável flora microbiana. Estes resultados não excluem a presença de *Dekkera/Brettanomyces* nos mostos de Vinho Verde branco, devido à elevada variabilidade entre lotes. No entanto, é plausível deduzir que se estiver presente esta espécie não será dominante.

Na Figura 16 apresentam-se algumas das fotografias obtidas das amostras de mosto em meio WL.

Pela análise da Figura 16, é facilmente observável que são várias as espécies presentes no mosto, sendo que algumas delas interagem com o corante Verde de Bromocresol, originando placas com coloração amarela (fila superior) e outras não afetam a coloração das placas, mantendo-se com a sua tonalidade verde/azulada original (fila inferior).

Na placa A, são observáveis colónias verdes escuras com a margem mais clara correspondente à descrição de *Hanseniaspora uvarum*; uma colónia central branca, enrugada e com aspeto farinhoso, correspondendo provavelmente *Pichia membranifaciens*; colónias brancas que ao longo do tempo foram adquirindo uma coloração mais azulada, tendo sido catalogadas como *Pichia anomala*; e ainda colónias

de morfologia semelhante a *P. anomala*, mas cuja coloração se manteve inalterada durante toda a incubação, sendo que nenhuma das descrições conhecidas era correspondente, mas que se poderiam tratar de colônias de *Pichia anomala* que não desenvolveram a sua coloração ao mesmo ritmo das restantes. As mesmas colônias são visíveis na placa C, na qual também é observável um fungo filamentososo que domina todo o lado esquerdo da placa. Em ambos os casos, as placas perderam a sua tonalidade verde/azulada original. Estas três espécies identificadas foram as mais comuns em mostos com a caracterização físico-química semelhante à da Amostra 1, apresentada na Tabela 6. Quando comparada a microbiologia das amostras num período inicial e após os 28 dias de armazenamento sob refrigeração, as colônias consideradas como *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia anomala* tornam-se dominantes enquanto que os fungos filamentosos e colônias identificadas como *P. membranifaciens* quase não são observáveis, apresentando aspeto mais semelhante à placa E. No mesmo mosto, e apenas num dos plaqueamentos, foram ainda observadas colônias com tonalidade rosa apresentadas na placa B, cuja morfologia correspondente ao género *Rhodotorula*.

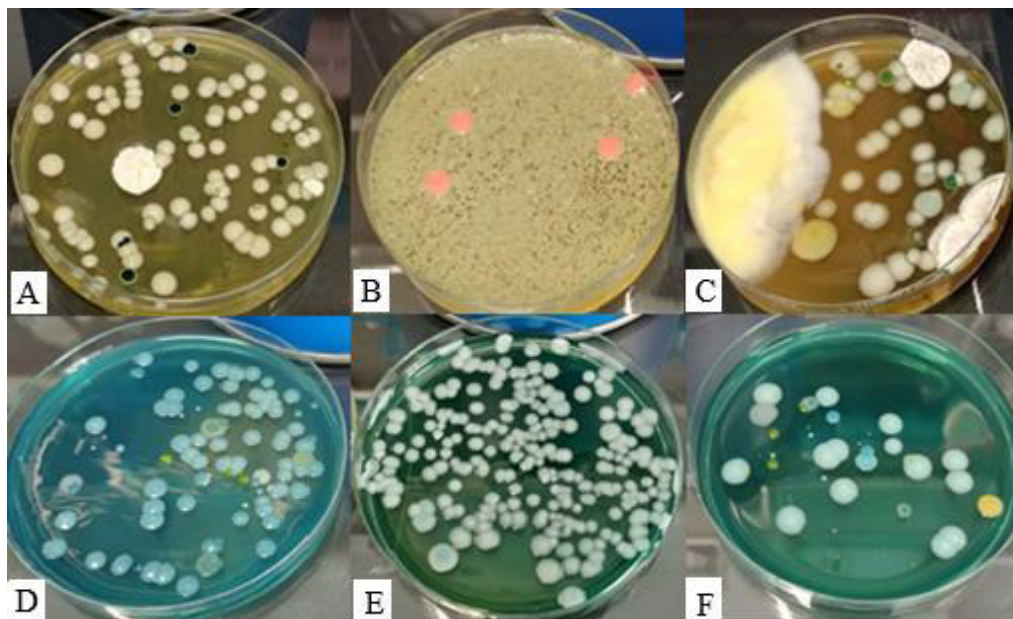





Figura 16. Fotografia de algumas das diferentes espécies nativas do mosto.

As percentagens relativas a cada espécie identificada, nas amostras de mosto não tratadas correspondentes aos instantes iniciais e finais, encontram-se resumidas na Tabela 7.

Tabela 7. Percentagens relativas das amostras identificadas no mosto não tratado

Amostra	Espécie	Concentração relativa / %		Aspeto
		Dia 0	Dia 28	
Tipo 1	<i>H. uvarum</i>	6.7 ± 4.3	1.7 ± 1.0	
	<i>P. membranifaciens</i>	1.9 ± 1.6	0.0 ± 0.0	
	<i>P. anomala</i>	58.3 ± 18.8	78.7 ± 31.5	

As alterações nas concentrações relativas das colónias ao longo do tempo podem ser explicadas pelo facto de *P. anomala* ser capaz de fermentar glucose, sucrose e assimilar vários açúcares, enquanto que *P. membranifaciens* tem uma menor capacidade fermentativa da glucose, assimilando muito menos compostos (Fugelsang & Edwards, 2007).

Vários autores reportam *Hanseniaspora uvarum* como a espécie encontrada em maior concentração nas uvas e no seu sumo, bem como no mosto durante as etapas iniciais e intermédias da fermentação, observável pela sua dominância nas amostras após 28 dias sob refrigeração (Fugelsang & Edwards, 2007).

As placas D e E apresentam colónias com morfologia distinta das anteriores, estando associadas aos mostos com a caracterização físico-química média semelhante à da Amostra 2, apresentada na Tabela 6. Nos mostos em que estas espécies são as predominantes, não houve um aumento significativo da carga microbiana ao longo do tempo, mesmo nas amostras não tratadas, e foram quase inexistentes as alterações da coloração do meio. É possível distinguir a presença de pequenas colónias verdes cor de ervilha, classificadas como *Schizosaccharomyces pombe*, bem como várias colónias azuis e amarelas que não foi possível identificar.

Em vários casos, foram observadas colónias punctiformes que não se desenvolveram com o tempo, como apresentado na Figura 17. Nesta figura são visíveis pequenos pontos com aspeto transparente/azulado que não amarelaram o meio, podendo tratar-se de bactérias ácidas lácticas. Essas mesmas colónias foram identificadas noutras placas com

colorações ligeiramente mais azuladas, mas sempre muito brilhantes. Uma vez que o meio WL não é recomendado para a sua contagem nem identificação, não foi possível confirmar de que espécie se tratava. Na maioria dos casos, estas colónias só se desenvolveram depois dos 4 dias de incubação estabelecidos como meta para a contagem de colónias, pelo que a sua presença foi registada, mas não foram contabilizadas para o número total de UFC mL⁻¹ na amostra. O facto de necessitarem de mais do que 4 dias de incubação vai, mais uma vez, de encontro à sua classificação como bactérias ácidas lácticas.



Figura 17. Placa WL com presença de colónias punctiformes.

Na maioria das situações em que este tipo de colónias foi observado, as restantes leveduras já conhecidas não se desenvolveram. Pode, portanto, tratar-se de uma situação de competição entre bactérias e leveduras, em que a presença de uma espécie inibe o crescimento das restantes.

Quando se procedeu à realização dos ensaios com *Dekkera*, além do plaqueamento em placas com meio YPD para a produção de *stocks*, a estirpe utilizada (PYCC 4801) foi plaqueada em meio WL para observação da sua morfologia e comparação com as colónias observadas nas amostras de mosto. A Figura 18 representa uma dessas placas.



Figura 18. Cultura pura de PYCC 4801 em meio WL.

Como seria de esperar pelas descrições apresentadas na literatura, o crescimento de *Dekkera* causa uma total alteração de cor do meio. Também é de notar o odor intenso a manteiga rançosa/leite fermentado na placa. As colónias apresentam uma falta de brilho, ao contrário de todas as espécies encontradas naturalmente nos mostos estudados.

Procedendo à caracterização das espécies, em nenhuma das amostras foram observadas colónias com morfologia semelhantes às descrições de *Saccharomyces cerevisiae*: são várias as colónias que apresentam a gama correta de colorações, mas nunca associadas à elevação umbiculada que as distingue. Estes resultados encontram-se de acordo aos descritos por outros autores, que relatam dificuldade em isolar esta a partir de uvas/mosto (Kántor *et al.*, 2017). Os valores reportados na literatura apontam para a presença de *S. cerevisiae* nos mostos em concentrações inferiores a 50 UFC mL⁻¹, um valor que corresponde a menos de 5 colónias em amostras não diluídas (Fugelsang & Edwards, 2007).

Para melhor compreender as diferenças entre os vários lotes de mosto, procedeu-se à incubação a temperatura e agitação constante, sendo o crescimento monitorizado indiretamente ao longo do tempo, recorrendo à leitura da absorvância das amostras. Com esses dados foram calculados os parâmetros específicos de crescimento para cada uma das amostras, apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros associados ao crescimento microbiológico, obtidos por ajuste dos dados experimentais

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
μ / h^{-1}	0.40 ± 0.05 ^a	0.27	0.15 ± 0.07 ^b
N_{max}	7.02 ± 0.35 ^a	4.57	6.11 ± 2.02 ^a

Considerando esses parâmetros para cada tipo de amostra e recorrendo à Equação 1, foram construídas as curvas de crescimento apresentadas na Figura 19.

Pela análise do gráfico, é possível observar que cada tipo de amostra possui um comportamento distinto, no que diz respeito à duração das várias fases associadas ao crescimento microbiano e à sua taxa específica de crescimento (μ).

Quando se contaram os valores iniciais de unidades formadoras de colónias em cada uma das amostras, observou-se que a Amostra 3 apresentava o valor mais baixo, de 3 000 UFC mL⁻¹, sendo o valor mais alto atingido na Amostra 2, com um total de

30 800 UFC mL⁻¹. Estes dados levam a crer que a estabilidade das amostras não tratadas não depende apenas da carga microbiana que contém, mas também do comportamento específico de cada espécie.

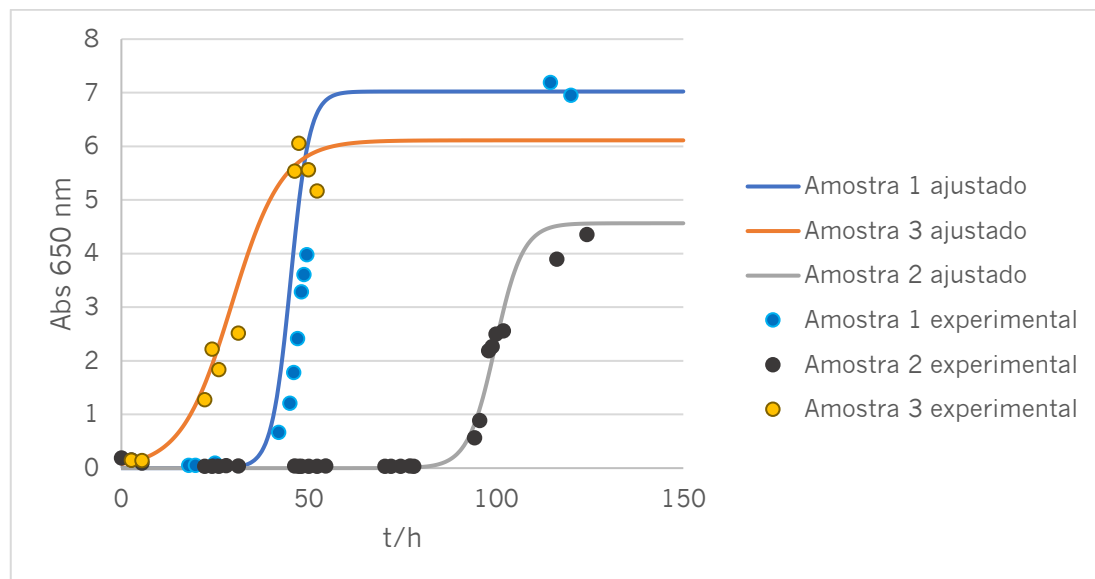


Figura 19. Curvas de crescimento médias de cada tipo de mosto.

É, também, importante referir que no que diz respeito à Amostra 2, dos três matrizes colocados a incubar, apenas num deles a absorvância sofreu alterações ao longo do tempo, pelo que, para essa amostra, a curva apresentada não é referente ao valor médio. Nos dois matrizes restantes a absorvância manteve-se constante ao longo do tempo. Quando foram plaqueadas em meio WL, observou-se que na amostra cuja absorvância sofreu alterações, as colónias eram semelhantes às apresentadas na placa A da Figura 16, enquanto que nos matrizes em que a absorvância não alterou significativamente, as colónias presentes eram semelhantes às apresentadas na placa D da mesma figura. Uma vez que os três matrizes continham amostras provenientes do mesmo lote, reforça-se a ideia da pouca homogeneidade entre as várias garrafas fornecidas.

Quando foi considerada a hipótese de acompanhar o crescimento microbiano por contagem celular, constatou-se que nas amostras de mosto existem muitos constituintes que influenciam a observação ao microscópio, estando as células rodeadas de vários fragmentos e estruturas cristalinas. Por essa razão, a técnica foi aplicada apenas nos crescimentos de cultura pura em meio líquido, pois este não apresenta resíduos de uvas esmagadas, nem uma constituição tão complexa.

4.3 Aptidão do mosto para a aplicação da tecnologia

Antes de realização dos ensaios em reator ôhmico com o mosto foram realizados ensaios preliminares com soluções de NaCl com várias concentrações. Na Tabela 9 são apresentados os valores de condutividade inicial para cada solução, medidos à temperatura ambiente com um condutivímetro. Com base no perfil de aquecimento das várias soluções foi avaliado o comportamento da condutividade em função da temperatura, de 30 °C a 90 °C.

Tabela 9. Valores de condutividade das soluções de cloreto de sódio em função da concentração e comparação com amostras de mosto

	Solução de NaCl				Mosto	
$M / (\text{mol L}^{-1})$	0.50	0.25	0.10	0.025	Amostra 1	Amostra 2
$\sigma / (\text{mS cm}^{-1})$	38.20	19.56	9.57	2.40	1.71 ± 0.00	2.23 ± 0.12

No decorrer da atividade experimental foi possível observar que todas as soluções possuem condutividade suficiente para serem submetidas a OH, sendo que quanto maior a concentração da solução, menor o tempo necessário para atingir uma determinada temperatura a campo elétrico constante.

Para a concentração mais elevada foi necessário operar a um campo elétrico inferior a 10 V cm^{-1} , de forma a conseguir manter o controlo da temperatura e não ultrapassar o valor desejado. Com campos elétricos superiores o aquecimento mostrou-se quase instantâneo e impossível de monitorizar. Pelo contrário, para a concentração mais reduzida observou-se a necessidade de aumentar o campo elétrico de operação, de modo a realizar o aquecimento num intervalo de tempo vantajoso: operando a 15 V cm^{-1} só é possível atingir 90 °C após 16 min, sendo esse tempo reduzido para 7 min quando se opera a 20 V cm^{-1} .

Outra dificuldade operacional identificada desde logo foi a possibilidade de sobreaquecimento do amplificador de sinal quando se opera por longos períodos de tempo e com campos elétricos elevados em soluções de menor concentração, interrompendo o fornecimento de corrente e causando um arrefecimento indesejado antes de se atingir a temperatura alvo. Este fator torna ainda mais essencial o compromisso entre um aquecimento rápido e um aquecimento mais lento, que deverá ser mais fácil de controlar.

A condutividade do mosto demonstrou ser inferior ou semelhante à da solução de NaCl menos concentrada estudada. Por esta razão, foi necessário avaliar se a condutividade natural do mosto permitiria atingir 90 °C num aquecimento a campo elétrico moderado, ou iria requerer adição de sais.

Para tal, amostras de mosto foram aquecidas de 30 °C a 90 °C com campos elétricos constantes. O perfil de aquecimento para três campos elétricos diferentes é apresentado na Figura 20.

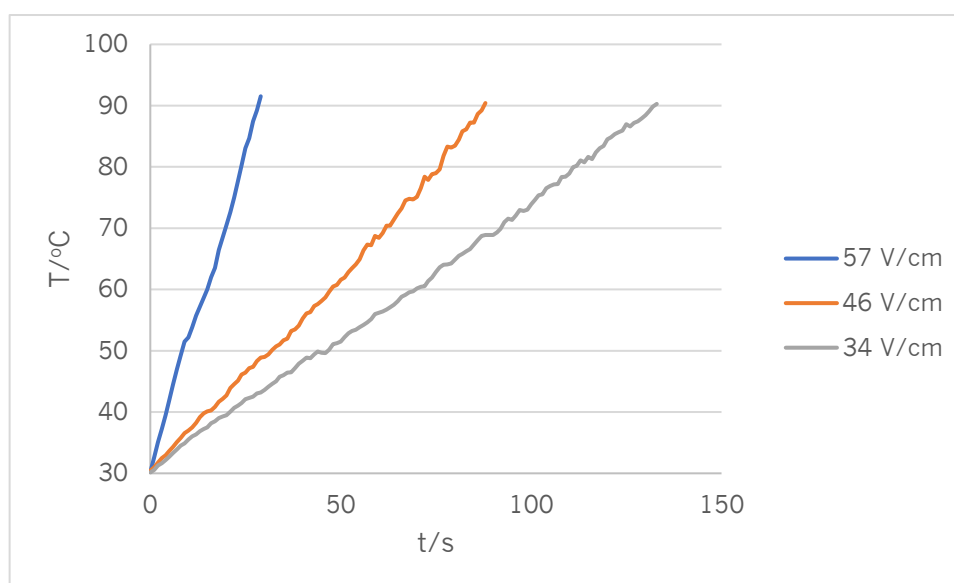


Figura 20. Perfis de aquecimento do mosto, consoante o campo elétrico aplicado.

Observando a Figura 20, é possível constatar que o aquecimento das amostras de mosto é facilmente realizável entre 30 e 90 °C, sendo que a temperatura aumenta uniformemente ao longo do tempo. À medida que se aumenta o campo aplicado a temperatura alvo é atingida num intervalo de tempo mais curto.

Na Figura 21 encontram-se representados os perfis de condutividade, em função da temperatura, das quatro soluções salinas e do mosto aquecido a três campos elétricos diferentes.

Como pode ser observado, os perfis de condutividade das soluções de NaCl variam consoante a concentração molar da solução: o declive da reta aumenta com o aumento da concentração. O perfil de condutividade do mosto aproxima-se, como seria de esperar, à da solução de NaCl de concentração 0.025 mol L⁻¹. Observa-se, ainda, que o perfil não é dependente do campo elétrico aplicado às amostras durante o tratamento.

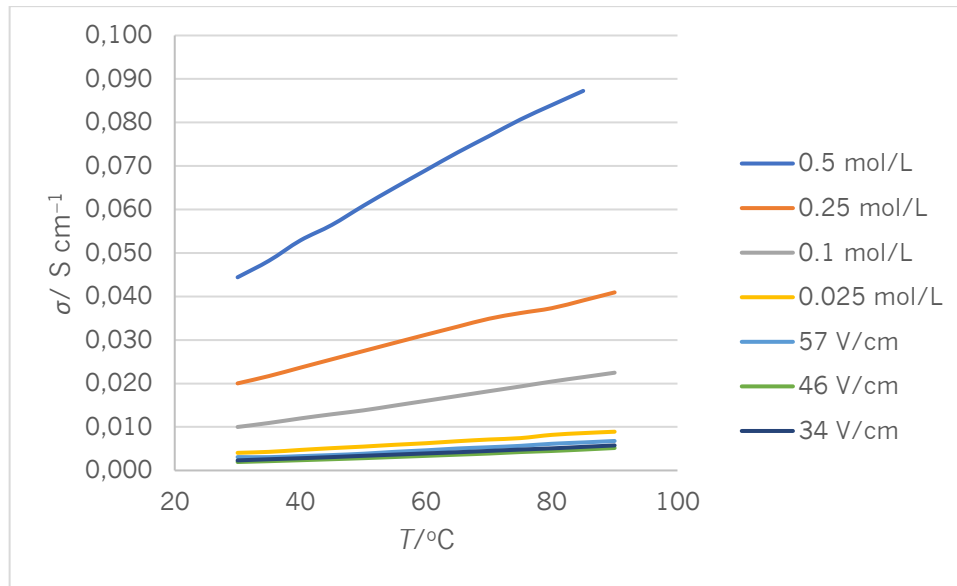


Figura 21. Perfis de condutividade das soluções salinas e mosto, aquecidos entre 30 °C e 90 °C.

Pela Equação 9, foram calculados os valores de condutividade das várias amostras de mosto aquecidas para cada temperatura. A correlação das duas grandezas é obtida pela representação gráfica apresentada na Figura 21 e respetiva regressão linear. A reta obtida é apresentada na Equação 10 e apresenta um coeficiente de correlação de 0.997.

$$\frac{\sigma}{S \text{ cm}^{-1}} = 6 \times 10^{-05} \times \frac{T}{^{\circ}\text{C}} + 0.0005 \quad \text{Equação 10}$$

4.4 Ensaios exploratórios de inativação

Os ensaios exploratórios de inativação em mosto tiveram como principal objetivo avaliar a capacidade da tecnologia de OH no controlo da carga microbiana presente.

Foram testados dois parâmetros, nomeadamente os binómios de pasteurização reportados na literatura e condições de temperatura moderadas (< 60 °C). Para tal, foram realizadas várias séries de experiências de inativação, cada uma com uma amostra diferente de mosto, e por essa razão com características microbiológica e físicas e químicas variáveis.

Numa última etapa, foram repetidas as análises de caracterização às amostras tratadas nas condições de maior interesse, de forma a avaliar o impacto dos tratamentos nas propriedades do mosto tratado.

4.4.1 Inativação por binómios de pasteurização

Foram avaliados três binómios de pasteurização diferentes: dois binómios de temperaturas elevadas e tempos curtos (72.5 °C por 15 s e 90 °C por 1 s) e um binómio de pasteurização lenta (65 °C por 30 min), sendo a temperatura alvo atingida por aplicação de um campo elétrico nas amostras.

Num primeiro momento, as três condições descritas foram testadas num mosto contendo uma carga inicial de 6.95×10^4 UFC mL⁻¹. Após plaqueamento das amostras tratadas não cresceu nenhuma colónia. Depois de mantidas por 28 dias em refrigeração e condições de assepsia, foi realizada uma nova caracterização das placas, não se tendo observado alguma alteração nas mesmas. Na amostra de controlo não tratada ocorreu formação de um biofilme na placa na diluição mais alta (1:100 000).

A nível operacional, considerou-se mais interessante o binómio de temperatura mais elevada e tempo mais curto, não só pela redução da duração do tratamento, mas pela facilidade de controlo da temperatura e possibilidade de operar a um campo elétrico constante e mais elevado, potenciando eventuais efeitos não-térmicos. Por essa razão deu-se mais ênfase aos tratamentos de 90 °C por 1 s, sendo a sua eficácia testada noutro lote de mosto distinto.

Nesse caso, para um mosto contendo uma média de 1.2×10^4 UFC mL⁻¹ iniciais e aplicando um campo elétrico de 35 V cm⁻¹, foi conseguida uma percentagem de inativação de (99.7 ± 0.1) %.

Na metade superior da Figura 22 são apresentadas as placas da amostra não tratada (em diluição de 1:10) e da amostra tratada (em diluição 1:1), correspondentes ao dia 0; sendo as placas obtidas após 28 dias de refrigeração das amostras apresentadas na fila inferior, em diluição 1:1 000 (placa C) e em diluição 1:1 (placa D). Ao fim dos 28 dias de refrigeração as placas resultantes das amostras tratadas não apresentaram nenhuma colónia.

É ainda de referir que as colónias de *Hanseniaspora uvarum* presentes nas amostras não tratadas não são observadas em nenhuma das placas dos tratamentos. Este facto não seria expectável pois estas colónias tornam-se as mais dominantes. Tal pode ser explicado pela sensibilidade da espécie a temperaturas altas (levando à sua inativação) mas maior tolerância que as restantes à combinação de temperaturas baixas e alterações de pH

resultantes da fermentação espontânea (causando o seu domínio em relação às outras espécies nas amostras não submetidas a tratamento). Estes dados são comprovados pelas informações disponíveis na literatura, que relatam um crescimento a partir dos 8 °C (“Viticulture & Enology,” 2016).

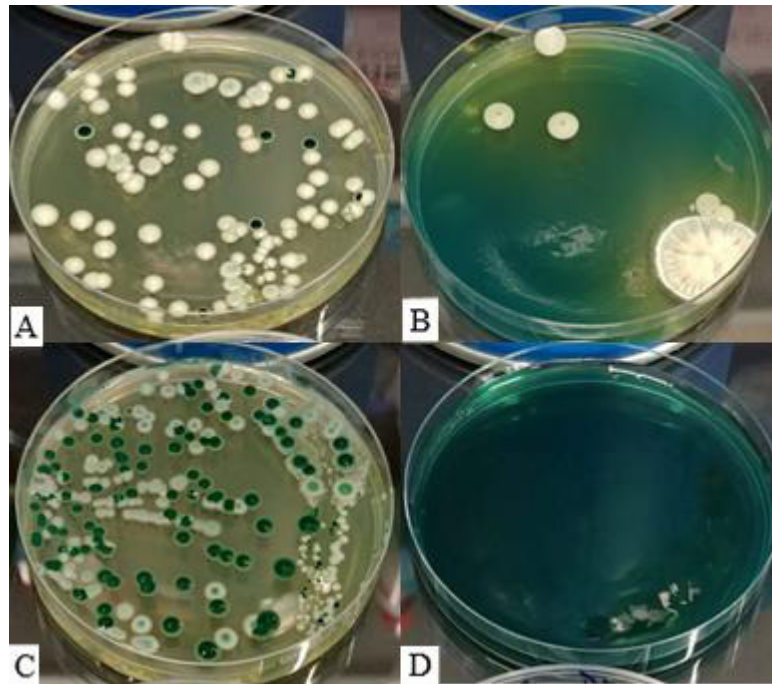


Figura 22. Amostra de mosto não tratado (A e C) e amostra de mosto aquecido a 90 °C (B e D), após o tratamento (fila superior) e 28 dias em refrigeração (fila inferior).

Na Tabela 10 são apresentadas as condições operacionais dos tratamentos apresentados na Figura 23, sendo que o campo elétrico se refere ao aplicado durante a fase de estabilização e o tempo de tratamento engloba a duração total do processo.

Tabela 10. Condições de operação para os tratamentos em binómio de pasteurização

Tratamento	$T / ^\circ\text{C}$	$CE / (\text{V cm}^{-1})$	t / s
A	90	0	269
B	72.5	35	38
C	72.5	0	319
D	90	69	29

As duas condições de pasteurização foram avaliadas em triplicado, numa etapa final, tendo sido atingidas quer por aplicação de campos elétricos (Tratamentos B e D), quer por aquecimento convencional com banho térmico (Tratamentos A e C), favorecendo a

rapidez dos tratamentos ôhmicos. Para atingir esse fim, o campo elétrico aplicado nos ensaios com corrente elétrica foi de 69 V cm^{-1} até se atingir a temperatura alvo seguido de um campo elétrico médio de 35 V cm^{-1} na fase de estabilidade térmica, caso do ensaio B.

Na Figura 23 são apresentados os perfis de aquecimentos para os casos em estudo.

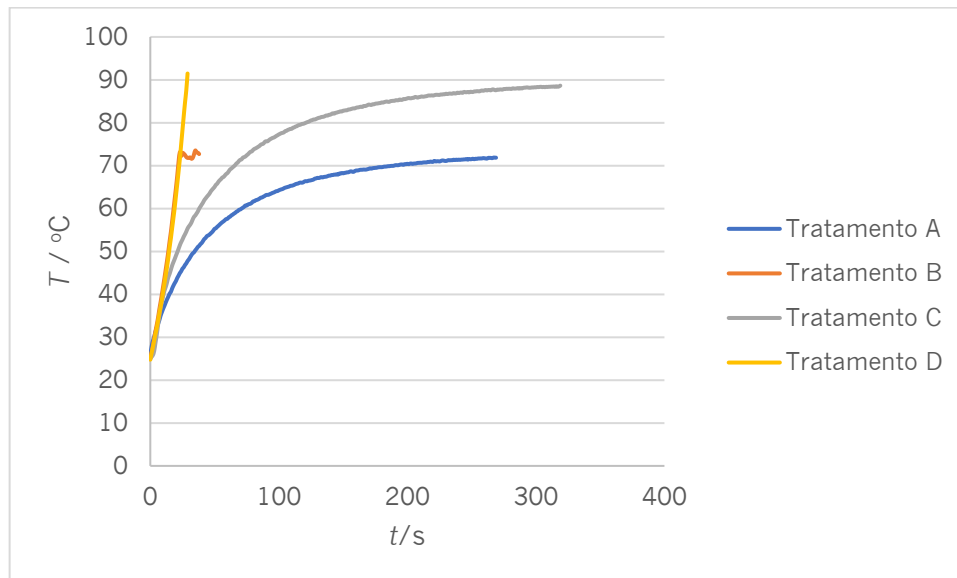


Figura 23. Perfis de aquecimento médios para os binômios de pasteurização.

É facilmente observável a diferença entre os ensaios realizados da forma convencional e os realizados com recurso à aplicação de campos elétricos: em menos de 30 s é possível atingir 90 °C numa operação com campo elétrico moderado (Tratamento D), enquanto o mesmo aquecimento ultrapassa os 5 min quando se usa apenas a camisa de aquecimento (Tratamento C). Além disso, recorrendo ao banho é complicado atingir 90 °C pois, além de ser difícil manter a temperatura do banho próxima da temperatura de ebulição da água sem que esta evapore e conservar essa temperatura durante todo o percurso de tubagens até ao reator, uma vez que a elevada amplitude térmica entre o ar circundante e a água levam ao seu arrefecimento antes de chegar ao reator contendo o mosto. Por outro lado, no aquecimento com campo elétrico a temperatura decresce rapidamente quando é desligado o fornecimento de corrente, enquanto no aquecimento convencional o arrefecimento é mais lento. Todos estes fatores levam a que, nos tratamentos convencionais, as amostras estejam expostas a mais unidades de pasteurização do que no tratamento correspondente com campo elétrico.

Em escala industrial, este problema seria resolvido pela utilização de permutadores de placas para aquecer as amostras. No entanto, o aquecimento nestes equipamentos está na mesma dependente da diferença de temperatura entre a amostra a aquecer e a que lhe fornecerá calor, sendo frequente o uso de vapor de água e há uma elevada perda de carga devido ao atrito entre o fluido e as superfícies metálicas dos permutadores, sendo necessário uma potência de bombeamento elevada. Além disso, pode ocorrer a formação de fouling por deposição de sólidos juntos aos componentes do permutador, funcionando como barreira térmica e diminuindo a eficácia do aquecimento.

Usando reatores óhmicos é possível contornar estas desvantagens, uma vez que o aquecimento resultante é direto e volumétrico, não depende de nenhum outro composto e a sua velocidade pode ser igual ou superior aos tratamentos convencionais, como já demonstrado.

No caso dos tratamentos a 72.5 °C durante 15 s verifica-se o mesmo comportamento, sendo necessários apenas 40 s para completar a operação na presença de campo elétrico (Tratamento B) e mais de 4 min para o aquecimento convencional (Tratamento A). É de notar, também, que existiu dificuldade no controlo da voltagem para manter a temperatura estável no valor alvo, uma vez que uma diferença na ordem dos mV origina uma alteração significativa na temperatura das amostras.

As quatro condições levaram a uma inativação total dos microrganismos presentes no mosto, uma vez que nos plaqueamentos das amostras tratadas por diluir não cresceram colónias. Não foi possível determinar com exatidão a carga inicial do mosto, mas foi estimado que se encontraria na gama das 1×10^5 UFC mL⁻¹.

Após os ensaios, as amostras foram mantidas assepticamente em alíquotas sob refrigeração durante 28 dias, período após o qual foi repetida a caracterização microbiológica, não se tendo verificado a presença de nenhuma colónia. As restantes alíquotas foram mantidas por 14 dias a temperatura ambiente mantendo, tendo sido comprovada a sua estabilidade.

Destes ensaios pode-se concluir que tratamentos com recurso a campos elétricos obtém resultados de inativação equiparáveis aos tratamentos com recurso a aquecimento convencional, estando também aliados a um tempo de operação bastante inferior. Por estes motivos a utilização desta tecnologia poderá ser extremamente vantajosa.

4.4.2 Ensaios de inativação em condições moderadas de temperatura

Para avaliar o efeito do campo elétrico na inativação de leveduras, começou-se por efetuar ensaios a temperaturas sub-letais e próximas da temperatura ótima de crescimento dos microrganismos, entre 25 °C e 30 °C.

A primeira tarefa foi a realização de ensaios de inativação a 28 °C, na presença de campos elétricos distintos, contra um controlo mantido à temperatura ambiente. Os parâmetros de operação e os resultados das contagens de unidades formadoras de colónias relativas aos tratamentos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Efeitos do campo elétrico na inativação a 28 °C

$T / ^\circ\text{C}$	t / min	$CE / (\text{V cm}^{-1})$	$CM / (\text{UFC mL}^{-1})$	
			Dia 0	Dia 28
25	0	0	$(1.18 \pm 0.10) \times 10^4$ ^a	$(2.85 \pm 0.78) \times 10^6$ ^a
28	30	1	$(7.97 \pm 1.36) \times 10^3$ ^b	$(0.98 \pm 1.24) \times 10^6$ ^a
28	30	20	$(8.50 \pm 0.78) \times 10^3$ ^b	$(0.87 \pm 1.24) \times 10^6$ ^a
28	30	29	$(7.27 \pm 0.97) \times 10^3$ ^b	$(0.81 \pm 1.07) \times 10^6$ ^a

Independentemente do campo elétrico aplicado ao mosto durante o tratamento, obtiveram-se percentagens de inativação a rondar os $(33.0 \pm 1.0) \%$. Além disso, pela análise estatística é possível constatar que não existem diferenças significativas entre os tratamentos, observando-se apenas diferença entre o controlo e as amostras tratadas.

Quando analisadas as amostras após 28 dias sob refrigeração, verificou-se, para todos os casos, um aumento da carga microbiana em relação ao instante inicial, de cerca de 2 ciclos logarítmicos, sendo que, após esse período, as diferenças entre as amostras tratadas e a não tratada se tornam estatisticamente sem significância. Das espécies presentes, só foram observadas colónias de *Pichia membranifaciens* nos plaqueamentos após o tratamento, enquanto que nas placas correspondentes ao dia 28 existiu uma predominância de *Pichia anomala*.

Com base nestes resultados foi realizada uma nova série de ensaios de inativação, usando como controlo uma amostra tratada sem a presença do campo elétrico. Neste ensaio foi também avaliado o efeito da frequência na inativação dos microrganismos. Na

Tabela 12 são apresentados os principais dados referentes a esses ensaios no dia dos tratamentos e após 28 dias sob refrigeração.

Tabela 12. Efeitos da frequência e da duração do tratamento na inativação a 28 °C

T/ °C	t/ min	CE/ (V cm ⁻¹)	Frequência / Hz	CM/(UFC mL ⁻¹)	
				Dia 0	Dia 28
28	30	0	0	$(7.13 \pm 1.60) \times 10^3$ a	$(2.10 \pm 1.51) \times 10^5$ a
28	30	4	50	$(5.93 \pm 0.16) \times 10^3$ a	$(1.03 \pm 0.15) \times 10^5$ a
28	30	2	25000	$(5.03 \pm 1.50) \times 10^3$ a	$(1.08 \pm 1.18) \times 10^5$ a
28	60	19	25000	$(5.40 \pm 1.31) \times 10^3$ a	$(1.20 \pm 1.33) \times 10^6$ a

O primeiro dado relevante destes ensaios é o facto da amostra de controlo deste conjunto de tratamentos (mantida a 28 °C) possuir uma carga microbiana inferior às restantes amostras não tratadas (mantidas a 25 °C), o que se justifica pela variabilidade das amostras de mosto, e consequentemente, diferente potencial para o desenvolvimento microbiológico. É possível, ainda, que um aumento de temperatura de 3 °C possa ter sido suficiente para inativar parte dos microrganismos.

Quando comparadas as amostras provenientes de tratamentos de 30 min e 60 min, constata-se que, nestas condições, não existe um efeito significativo resultante do prolongamento dos tratamentos. A frequência de 50 Hz usada num dos ensaios não demonstrou inativação capaz de compensar o risco de corrosão dos eléctrodos e subsequente contaminação das amostras com partículas metálicas deles provenientes, pelo que não foi considerada uma variável de investigação neste estudo.

Com base nestes resultados, a tarefa seguinte consistiu na verificação de possíveis efeitos sinérgicos entre o aumento da temperatura e a aplicação de campos eléctricos moderados. Para tal, os tratamentos foram realizados a temperaturas superiores à temperatura ambiente, mas inferiores à temperatura de pasteurização já investigada, mais especificamente entre 40 °C e 50 °C quer na presença ou ausência de campo eléctrico. Uma vez que nos ensaios anteriores não se constatou um interesse em aumentar a duração do tratamento, foi testada a eficácia de operar apenas por um segundo, com o campo eléctrico mais elevado, comparando com a aplicação de campos eléctricos mais reduzidos por períodos mais alargados de tempo (30 min). Na Tabela 13 estão resumidas as informações sobre esses ensaios.

Tabela 13. Efeitos da inativação a 40 °C e 50 °C

<i>T</i> / °C	<i>t</i> / s	<i>CE</i> / (V cm ⁻¹)	<i>CM</i> / (UFC mL ⁻¹)	
			Dia 0	Dia 28
25	0	0	$(1.30 \pm 0.42) \times 10^4$ ^a	Mais de 300 UFC em diluição 1:1 000
40	1800	0	$(6.60 \pm 0.28) \times 10^3$ ^a	
40	1800	32	$(8.00 \pm 1.13) \times 10^3$ ^a	
40	1	91	$(8.55 \pm 0.64) \times 10^3$ ^a	
50	1800	0	Mais de 300 UFC	
50	1800	32	em diluição 1:1	
50	1	91	$(8.00 \pm 0.85) \times 10^3$ ^a	

Pela análise dos dados apresentados na Tabela 13 é possível verificar que todas as condições (com exceção dos ensaios a 50 °C durante 30 min) levaram a uma diminuição aparente da carga microbiana presente, mas sem significância estatística.

Nestes ensaios, tanto na presença como na ausência de campo elétrico, é perceptível pelas imagens apresentadas na Figura 24 que existiu inativação das leveduras de degradação já identificadas, contudo pequenas colónias punctiformes verdes/azuladas capazes de acusar o amarelamento do meio cresceram de forma dominante.

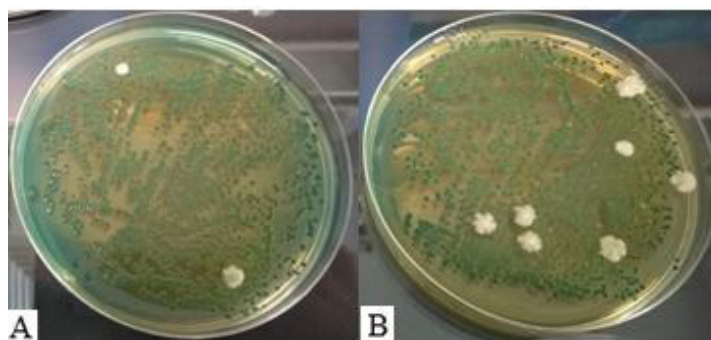


Figura 24. Placas representativas dos ensaios a 50 °C, na ausência (A) e presença de campo elétrico (B).

Uma vez que essas colónias são visíveis nas placas da amostra não tratada, é improvável que se tratem de uma contaminação. Estas colónias não correspondem à descrição das bactérias ácidas lácticas, visto só se manifestarem após 10 dias, mas é possível que se tratem de bactérias ácidas acéticas, descritas na literatura como colónias punctiformes de coloração verde extremamente intensa. O facto de o corante presente nas

placas ser consumido/reagido com os compostos libertados durante o metabolismo e as placas apresentarem uma coloração amarelada corrobora essa hipótese.

Nos ensaios rápidos, com o campo elétrico mais elevado, o tipo de colónias presentes nas placas ao fim de 4 dias de incubação é totalmente distinto. Na Figura 25 são apresentadas duas imagens representativas desses tratamentos.

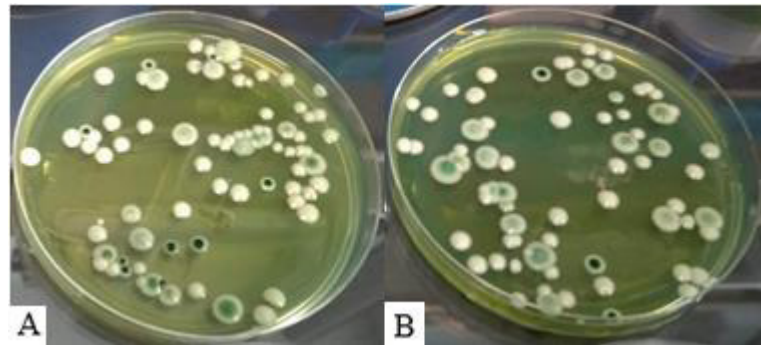


Figura 25. Placas representativas dos ensaios de pulso a 40 °C (A) e 50 °C (B).

Nestas placas, é possível observar as colónias identificadas como *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia anomala*, estando ausentes as potenciais bactérias ácidas acéticas. Este resultado, apesar da baixa taxa de inativação, demonstra que os tratamentos em pulsos podem ser relevantes para o controlo da população bacteriana. Devido a estes resultados, decidiu-se explorar este estilo de tratamentos nos ensaios finais.

As placas correspondentes às amostras tratadas à temperatura de 40 °C apresentaram uma microbiologia intermédia, com presença das leveduras e das bactérias ácidas acéticas identificadas previamente. Uma vez que os resultados não foram os desejados, nos ensaios finais optou-se pela operação a 45 °C, no sentido de esclarecer o efeito de competição entre as bactérias e as leveduras presentes no mosto.

Após 28 dias a 4 °C, as amostras foram novamente caracterizadas, mas não foi possível a determinação da concentração de microrganismos, uma vez que todas as placas se apresentaram com mais das 300 colónias recomendadas para contagem. Em todos os casos, ocorreu uma alteração total da coloração das placas de azul esverdeado para amarelo e estas apresentaram um odor forte a “azedo” quando abertas.

Nestes ensaios, resumidos nas Tabelas 11 a 13, foi feito o estudo da propensão das quatro espécies de leveduras predominantes neste tipo de amostra para sobreviverem aos tratamentos, sem que se conseguisse observar uma espécie mais resistente. A longo prazo

foi possível retirar conclusões, não existindo crescimento das colónias de *Pichia membranifaciens*.

Noutra linha de ensaios, e devido aos encorajadores resultados de inativação nas condições de pasteurização, optou-se por explorar um menor tempo de operação na pasteurização mais lenta, com intuito de otimizar a duração do processo sem comprometer a capacidade de inativação. Para tal, realizou-se o tratamento a 60 °C durante 15 min e 30 min, num mosto contendo uma concentração inicial de 2.00×10^3 UFC mL⁻¹. No instante inicial, as percentagens de inativação foram de 100 % e 99.5 %, respetivamente, sendo que não se considerou essa diferença significativa por se tratar de apenas uma colónia na placa (valor abaixo do limite de contagem). Com base nestes resultados, foi tomada a decisão de encurtar o tempo de processamento para 15 min nos ensaios finais, uma vez que este valor permitiria atingir a mesma eficácia em metade do tempo, com todas as poupanças energéticas e laborais associadas.

Assim, foi realizado um conjunto final de tratamentos complementares aos apresentados na Figura 23, no qual foram estudadas temperaturas de 45 °C e 65 °C com as quatro condições mais interessantes: tratamentos longos com e sem presença de campo elétrico, e tratamentos curtos (1 s), na forma de um pulso ou três pulsos sucessivos.

Na Tabela 14 são apresentadas as condições operacionais dos tratamentos apresentados na Figura 26, sendo que o campo elétrico se refere ao aplicado durante a fase de estabilização e o tempo de tratamento engloba a duração total do processo.

Tabela 14. Condições de operação para os tratamentos moderados

Tratamento	<i>T</i> / °C	<i>CE</i> / (V cm ⁻¹)	<i>t</i> / s
E	65	0	1244
F	65	22.4	1231
G	45	0	1976
H	45	22.4	1997
I	45	68.7	22
J	45	68.7	152
K	65	68.7	53
L	65	68.7	410

Na Figura 26 são apresentados os perfis dos diversos tratamentos realizados a 65 °C, sendo estes idênticos para tratamentos realizados a 45 °C.

Os Tratamentos E e F correspondem, respetivamente, a tratamentos de 15 min com aquecimento convencional e por aplicação de um campo elétrico de 22 V cm⁻¹. Os Tratamentos G e H, não representados na figura, possuem um perfil de aquecimento semelhante aos Tratamentos E e F, sendo o objetivo manter uma temperatura de 45 °C por 30 min. Nos restantes tratamentos, o objetivo foi avaliar o efeito de um pulso (Tratamentos I e K) e de três pulsos consecutivos (Tratamentos J e L), mediante a aplicação de um campo elétrico de 69 V cm⁻¹. Nos tratamentos de vários pulsos consecutivos recorreu-se à camisa do reator para reduzir a temperatura entre os pulsos.

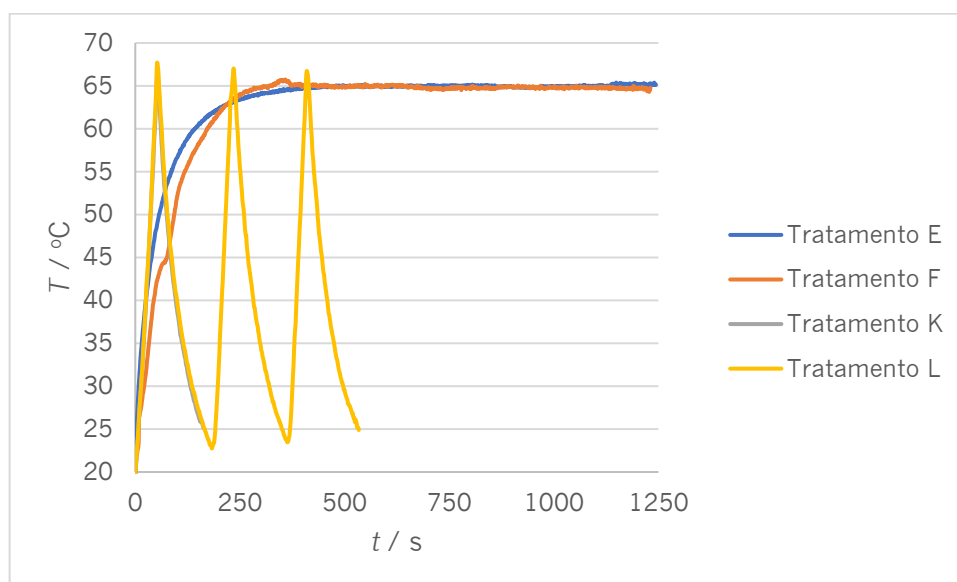


Figura 26. Perfis de aquecimento médios para os ensaios a 65 °C.

Não foi possível determinar com exatidão a concentração de microrganismos inicial do mosto, mas estimou-se que esta rondaria as 1x10⁵ UFC mL⁻¹. Para os Tratamentos E e F a inativação foi absoluta, obtendo-se placas azuis após o período de incubação, sendo que nas das restantes amostras tratadas o crescimento foi excessivo, resultando na formação de um biofilme, pelo que nenhum desses tratamentos foi capaz de inativar significativamente a carga presente no mosto.

Uma vez que as amostras foram mantidas durante 14 dias à temperatura ambiente e 28 dias sob refrigeração, foram calculadas as percentagens de inativação dos tratamentos, que estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15. Percentagens de inativação médias dos tratamentos moderados de maior interesse

	% inativação 14 dias	% inativação 28 dias
Tratamento E	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a
Tratamento F	100.0 ± 0.0 ^a	100.0 ± 0.0 ^a
Tratamento G	91.7 ± 2.3 ^a	83.3 ± 1.8 ^a
Tratamento H	94.0 ± 2.2 ^a	86.7 ± 12.3 ^a
Tratamento I	92.4 ± 2.9 ^a	77.5 ± 4.9 ^a
Tratamento J	89.4 ± 13.4 ^a	77.1 ± 29.8 ^a
Tratamento K	94.6 ± 6.1 ^a	51.5 ± 67.2 ^a
Tratamento L	87.9 ± 0.2 ^a	77.8 ± 22.4 ^a

Com base na análise estatística efetuada aos dados apresentados, não foi possível retirar nenhuma conclusão quanto a qual dos tratamentos será mais favorável, uma vez que as diferenças entre eles não são significativas devido ao desvio padrão associado a algumas das contagens de unidades formadoras de colónias. Por outro lado, uma vez que apenas dois dos tratamentos resultaram em placas sem nenhuma colónia, considera-se que essas condições são de maior interesse para aplicação da tecnologia, sem descartar a necessidade de realização de mais ensaios de forma a comprovar a eficácia dos tratamentos.

A possibilidade de utilização de tratamentos em pulso, como alternativa aos tratamentos contínuos de longa duração, releva-se interessante devido à drástica redução do tempo de operação que permite. Além disso, este sistema de inativação pode ser usado a longo prazo, fornecendo um pulso sempre que se verificar alterações na quantidade microbiana do mosto, de forma a manter a sua estabilidade por longos períodos de tempo, e sem as possíveis desvantagens organolépticas de manter a matriz alimentar a temperaturas elevadas por extensos períodos de tempo.

4.4.3 Efeito dos ensaios de inativação nas características físico-químicas do mosto

O último ponto em análise nesta etapa de ensaios preliminares foi a avaliação do impacto dos tratamentos nas características físico-químicas das amostras, uma vez que um tratamento ideal leva à inativação das espécies de degradação presentes sem

comprometer a capacidade do mosto para fermentar, quando inoculado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Dessa forma, é desejável que os tratamentos não afetem o valor dos açúcares disponíveis para fermentação, enquanto que a diminuição de compostos passíveis de prejudicar a estabilidade do vinho em garrafa (como um elevado teor proteico) pode ser vista como um efeito que acresce valor ao tratamento.

Para esse fim, foram determinados os parâmetros de pH, SST, AR, TP e AT, assim como a monitorização do oxigénio dissolvido ($[O_2]$) nos vários tratamentos considerados como de maior interesse. Na Tabela 16 são apresentados os resultados obtidos nesta caracterização.

Na maioria destes parâmetros a aplicação dos tratamentos nas diferentes condições de operação não resulta em diferenças com significância estatística relevante. Nos casos em que estas diferenças ocorrem, não são relevantes a nível de processo pois tratam-se de casos isolados, sem nenhuma tendência associada.

A $[O_2]$ é o único parâmetro em que alguns tratamentos se destacam do controlo: os dois tratamentos contínuos a 65 °C, o tratamento convencional a 72.5 °C e o tratamento a 45 °C com três pulsos contínuos. Assim, os tratamentos em que a carga térmica aplicada é superior (quer devido à duração quer pelo fator de repetição) aparentam influenciar este parâmetro.

Tendo em consideração que o processo de remoção de SO_2 aplicado atualmente pela empresa envolve o aquecimento do mosto a 120 °C, mais agressivo do que todos os tratamentos estudados, é espectável que a possível alteração nas propriedades do mosto causada pelos tratamentos óhmicos seja menos perceptível.

Concluiu-se, assim, que os ensaios a 90 °C, além de serem capazes de inativar toda a carga presente no mosto, fazem-no em condições que não levam alteração dos seus parâmetros físico-químicos iniciais.

Tabela 16. Efeito dos vários tratamentos na composição do mosto

Tratamento	pH	<i>SST</i> / °Brix	<i>AR</i> / (g L ⁻¹)	<i>TP</i> / (mg L ⁻¹)	<i>AT</i> / (g L ⁻¹)	[O ₂] / (mg L ⁻¹)
Controlo	3.25 ± 0.01 ^a	20.18 ± 0.13 ^a	349.4 ± 20.8 ^a	20.0 ± 7.34 ^a	6.39 ± 0.40 ^a	9.48 ± 1.02 ^a
A	3.26 ± 0.06 ^a	20.10 ± 0.17 ^a	358.7 ± 78.9 ^a	23.83 ± 8.42 ^a	6.05 ± 0.11 ^a	7.97 ± 0.18 ^b
B	3.26 ± 0.01 ^a	19.87 ± 0.12 ^a	298.4 ± 3.2 ^a	30.14 ± 12.89 ^a	5.88 ± 0.09 ^a	9.28 ± 0.53 ^a
C	3.30 ± 0.03 ^a	20.17 ± 0.12 ^a	312.0 ± 26.2 ^a	26.08 ± 5.75 ^a	6.48 ± 0.04 ^a	8.60 ± 0.41 ^a
D	3.30 ± 0.03 ^a	19.80 ± 0.10 ^a	306.1 ± 11.6 ^a	28.33 ± 5.12 ^a	6.05 ± 0.09 ^a	0.23 ± 0.91 ^a
E	3.28 ± 0.05 ^a	20.33 ± 0.06 ^a	317.8 ± 34.2 ^a	27.58 ± 2.64 ^a	6.60 ± 0.39 ^a	7.88 ± 0.33 ^b
F	3.32 ± 0.04 ^a	20.00 ± 0.10 ^a	288.6 ± 21.9 ^a	25.93 ± 4.33 ^a	6.60 ± 0.20 ^a	7.70 ± 0.28 ^b
G	3.27 ± 0.03 ^a	19.77 ± 0.35 ^a	317.8 ± 5.6 ^a	32.99 ± 0.94 ^a	6.73 ± 0.37 ^a	8.47 ± 0.79 ^a
H	3.34 ± 0.02 ^b	19.87 ± 0.12 ^a	298.9 ± 8.0 ^a	29.68 ± 4.75 ^a	6.60 ± 0.53 ^a	8.35 ± 0.27 ^a
I	3.27 ± 0.01 ^a	19.87 ± 0.21 ^a	342.8 ± 14.5 ^a	36.14 ± 2.08 ^b	6.15 ± 0.07 ^a	9.40 ± 0.79 ^a
J	3.31 ± 0.04 ^a	19.83 ± 0.15 ^a	309.7 ± 12.5 ^a	39.14 ± 1.56 ^b	6.28 ± 0.16 ^a	11.50 ± 1.00 ^b
K	3.30 ± 0.03 ^a	19.97 ± 0.12 ^a	329.9 ± 10.5 ^a	35.24 ± 3.61 ^a	6.03 ± 0.17 ^a	9.77 ± 0.69 ^a
L	3.32 ± 0.02 ^a	19.70 ± 0.17 ^b	330.3 ± 19.2 ^a	30.44 ± 3.13 ^a	5.90 ± 0.11 ^a	8.88 ± 0.74 ^b

4.5 Ensaio de inativação com a levedura PYCC 4801

Devido às dificuldades encontradas nos tratamentos de inativação com os microrganismos nativos do mosto (falta de homogeneidade nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, competição entre leveduras e bactérias, aparecimento de fungos filamentosos) optou-se por realizar ensaios com uma cultura pura. Foi escolhida uma estirpe do microrganismo *Dekkera/Brettanomyces* por esta ser dos microrganismos que afeta de forma mais negativa o vinho.

Com base nos dados dos ensaios preliminares de inativação, selecionaram-se os tratamentos a replicar na levedura *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801, sendo eles um dos binômios de pasteurização capaz de uma inativação total das leveduras e um dos tratamentos em condições moderadas. O mosto previamente autoclavado, isento da sua microflora nativa, foi inoculado com a levedura, numa concentração superior à encontrada naturalmente nas uvas: $(1.27 \pm 0.40) \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Dos binômios de pasteurização, o tratamento a 90 °C por 1 s foi o escolhido por corresponder ao tempo mais curto de operação, pela facilidade em operar com campo elétrico constante e elevado, e sobretudo por não causar alterações significativas em nenhum dos parâmetros de caracterização física e química do mosto sendo, portanto, apropriado para aplicação nesta matriz alimentar. Uma vez que a principal vantagem deste tratamento é a sua rapidez, não se simulou o perfil do aquecimento convencional, tendo este sido realizado apenas para comparação entre as percentagens de inativação.

Uma vez que não ficou provado nos tratamentos preliminares o efeito do campo elétrico na inativação de leveduras, optou-se por reproduzir os tratamentos a 45 °C por 30 min, por esta condição operacional levar a um maior tempo de exposição das amostras ao campo elétrico. Neste caso, o campo elétrico foi ajustado de forma a simular o perfil de aquecimento convencional, para uma melhor comparação entre as duas condições.

Os valores de campo elétrico aplicados e as contagens de unidades formadoras de colónias, para cada tratamento, encontram-se resumidos na Tabela 17. O tempo apresentado corresponde à duração total do tratamento (tempo necessário para atingir a temperatura alvo e tempo em que a amostra esteve exposta a essa temperatura).

Com base nos valores apresentados na Tabela 17, constata-se, novamente, que o aquecimento a 45 °C por 30 min é capaz de diminuir a concentração de microrganismos

no mosto. No entanto, comparando os dois tratamentos realizados nessas condições, não se verificam diferenças no número de unidades formadoras de colónias, não sendo possível inferir o efeito da aplicação do campo elétrico.

Tabela 17. Condições operacionais e contagens em placa dos tratamentos com a levedura PYCC 4801

Tratamento	CE / (V cm ⁻¹)	t / s	CM / (UFC mL ⁻¹)
Controlo a 25 °C	0	1 800	(1.27 ± 0.40) × 10 ⁸ ^a
Aquecimento a 45 °C	0	1 990	(4.17 ± 1.75) × 10 ⁷ ^b
Aquecimento a 45 °C	38	1 989	(5.38 ± 1.40) × 10 ⁷ ^b
Aquecimento a 90 °C	0	479	0 ^c
Aquecimento a 90 °C	92	45	(1.32 ± 1.01) × 10 ³ ^c

O aquecimento realizado nas condições de pasteurização prova ser o mais eficiente, uma vez mais. No tratamento convencional a inativação é total, sendo inferior no caso do tratamento com campo elétrico. Este facto pode ser explicado pela diferença de duração do tratamento, uma vez que no tratamento convencional a amostra está exposta a temperaturas superiores a 60 °C por vários minutos (4 min) e, no tratamento óhmico, essa exposição é encurtada para valores na gama dos segundos (20 s). Apesar disso, considerando a concentração de microrganismos inicial, as percentagens de inativação de ambos aproximam-se de 100 %, o que justifica o facto de a análise estatística efetuada não considerar significantes as diferenças entre os tratamentos.

As imagens das placas mais representativas são apresentadas nas Figuras 27 e 28.

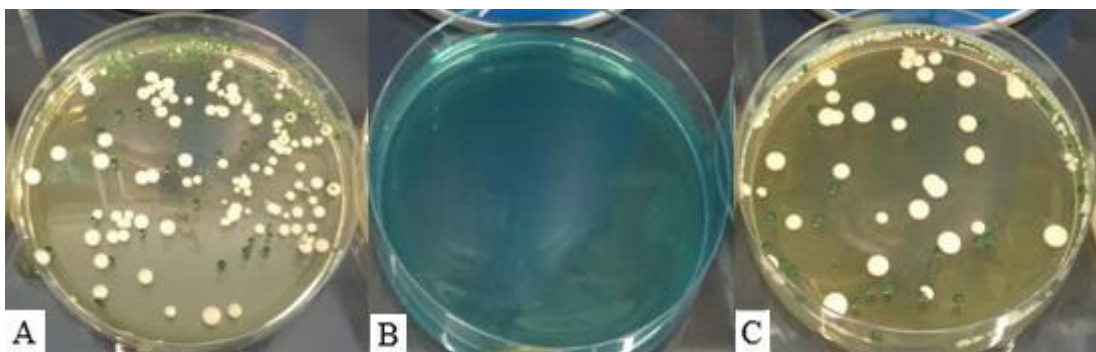


Figura 27. Amostra de controlo em diluição 1:1 000 (A) e amostras aquecidas a 90 °C, por diluir, dos tratamentos na ausência (B) e presença (C) de campo elétrico.

Como é possível observar na placa correspondente ao controlo (imagem A) existiu crescimento de colónias de *Dekkera bruxellensis*, com aspeto branco, e outras com aspeto verde escuro. Essas colónias indesejadas, podem dever-se a uma contaminação cruzada.

No tratamento convencional em condições de pasteurização, todas as espécies são eliminadas, ao contrário do tratamento na presença de campo elétrico, em que as colónias presentes se assemelham às aquelas identificadas no controlo.

Nos tratamentos mais longos, a 45 °C, o comportamento é distinto, como é possível observar na Figura 28.

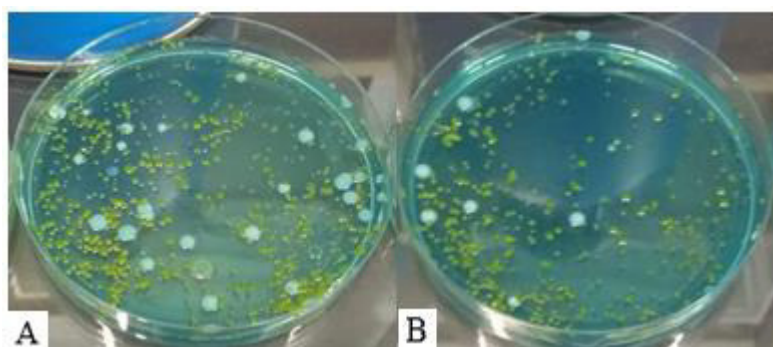


Figura 28. Amostras aquecidas a 45 °C, em diluição 1:10, dos tratamentos na ausência (A) e presença (B) de campo elétrico.

Nestas condições, as colónias que sobressaem na placa não correspondem às visíveis no controlo, mas a outras colónias já identificadas em tratamentos anteriores e apresentadas na Figura 16. Independentemente dessa situação, mais uma vez se observa que os tratamentos produzem resultados idênticos e independentes do campo elétrico aplicado.

Todas as amostras foram preservadas em meio líquido e a temperatura ambiente durante um mês. Contudo, a produção excessiva de gás levou à abertura dos falcons, originando perdas de cultura e contaminações, impossibilitando assim uma nova caracterização microbiológica.

Com base nestes resultados, optou-se por efetuar um novo conjunto de ensaios com a levedura PYCC 4801, avaliando as três formas de operação da condição mais favorável: o aquecimento a 90 °C por 1 s com banho térmico, com campo elétrico de forma a simular o perfil de aquecimento convencional e com campo elétrico promovendo a rapidez do tratamento.

Para recorrer à contagem celular por microscopia, realizou-se uma nova série de ensaios com meio YPD de condutividade ajustada. Não se prosseguiram os estudos em mosto autoclavado pois o processo leva à caramelização dos açúcares do meio, alterando a cor e o teor em matéria precipitada no mesmo, dificultando os métodos visuais de monitorização.

Assim, procedeu-se à inoculação do meio YPD líquido, diluído com água destilada de forma a apresentar a mesma condutividade do mosto, com a levedura alvo. Os tratamentos foram plaqueados em meio YPD contendo agar, e não o usual meio WL.

Esta etapa de tratamento teve como objetivo avaliar a eficácia dos tratamentos promissores e, sobretudo, testar a sua estabilidade no “pior cenário possível”: partindo de uma carga inicial na ordem dos 1×10^6 UFC mL^{-1} , as amostras foram tratadas e mantidas posteriormente a temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C}$), com agitação, em matrizes com rolha de algodão e gaze, permitindo trocas gasosas com o meio envolvente.

Foi realizada a monitorização da temperatura média das amostras e o seu crescimento foi avaliado com base em contagens de colónias em placa, contagens celulares em câmara de Neubauer e valores de absorvância a 650 nm .

Os perfis de aquecimento médios dos tratamentos são apresentados na Figura 29.

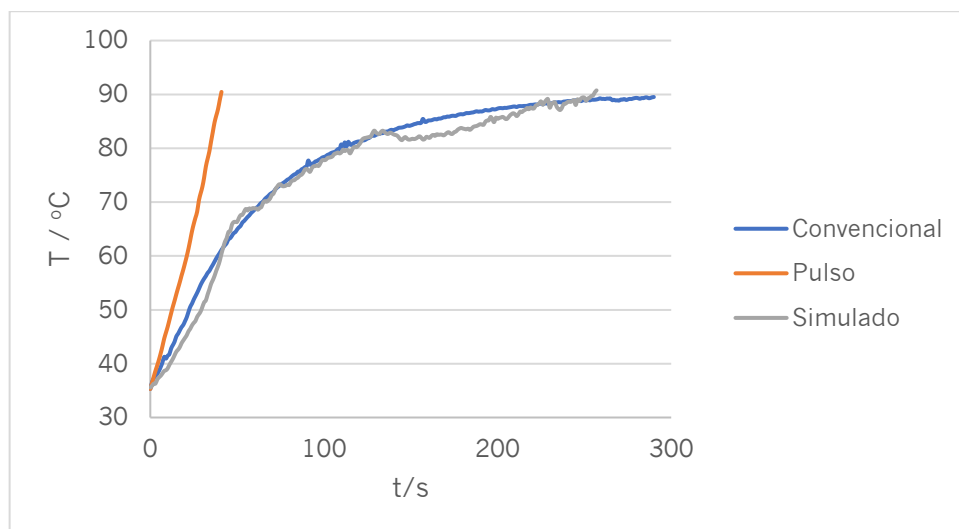


Figura 29. Perfis de aquecimento médios correspondentes às três formas de operação.

No caso do aquecimento em pulso, dado que o objetivo seria a obtenção da temperatura alvo no menor tempo possível, a operação decorreu à voltagem mais elevada permitida pelo amplificador de sinal, correspondendo a um campo de 49 V cm^{-1} . No aquecimento

simulado, de forma a aproximar tanto quanto possível à situação convencional, a voltagem variou entre 2 V e 2.2 V, sendo o campo médio correspondente de 34 V cm⁻¹. Como pode ser observado pela Figura 29, os perfis de aquecimento são, de uma forma geral, sobreponíveis, sendo as diferenças correspondentes à variação do campo elétrico na gama dos 200 mV.

Mais uma vez, é reforçada a ideia de que o OH permite reduzir drasticamente a duração mínima dos tratamentos, mas, quando desejado, também permite simular as situações de aquecimento com banho térmico.

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da contagem em placa após os tratamentos, bem como os índices correspondentes à análise estatística aos dados. Efetuando a análise estatística ao conjunto dos quatro tratamentos, as diferenças entre os três modos de operação não foram significativas.

Tabela 18. Resultados de inativação dos ensaios a 90 °C, em três modos de operação distintos

Tratamento	CM / UFC mL⁻¹
Controlo	$(1.00 \pm 0.00) \times 10^7$ ^a
Aquecimento Convencional	0 ^b
Aquecimento em Pulso	$(1.13 \pm 0.81) \times 10^2$ ^b
Aquecimento Simulado	$(1.17 \pm 0.38) \times 10^2$ ^b

Após os tratamentos, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente, correspondendo a 19 °C e 24 °C durante o período da noite e do dia, respetivamente, padrão que se verificou diariamente.

Com base nos valores de absorvância das amostras, aliados à determinação da concentração celular, a estabilidade microbiológica das amostras foi monitorizada. Na Figura 30 encontram-se os valores de concentração celular para os vários momentos de amostragem, sendo as barras de erro representativas do desvio padrão entre os triplicados realizados.

O primeiro facto de relevo é a diminuição nas células observáveis ao microscópio da amostra de controlo para as amostras tratadas, significando que os tratamentos a 90 °C por 1 s são capazes de destruir total ou parcialmente algumas leveduras, tornando-as

inidentificáveis quando observadas ao microscópio. As restantes leveduras, apesar de ainda intactas, não foram capazes de se reproduzir.

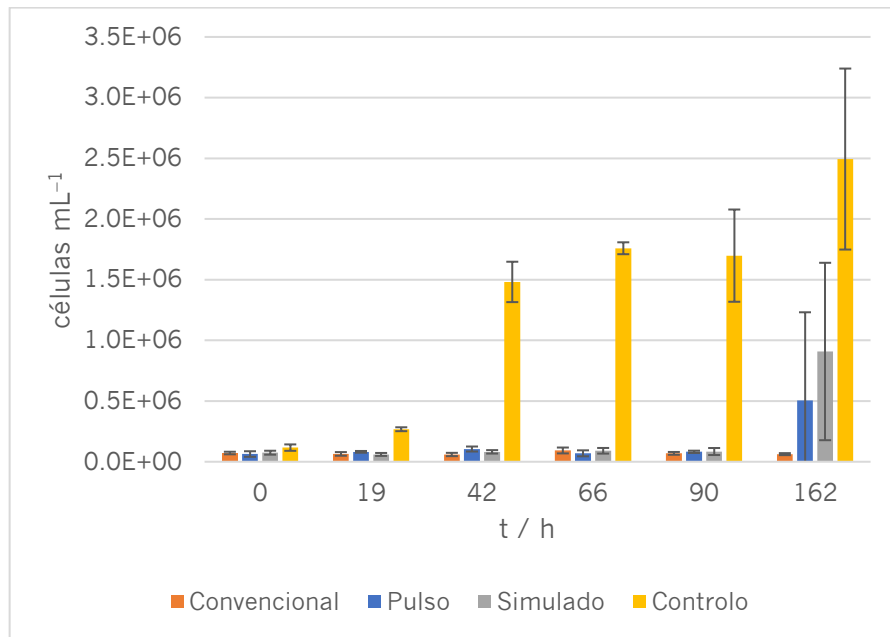


Figura 30. Estabilidade dos tratamentos ao longo do tempo, com base na sua concentração celular.

No período de 90 h não é observável nenhuma alteração nas amostras tratadas, apresentando contagens celulares iguais entre si. Na amostra de controlo, o crescimento é imediato, uma vez que não correu a inativação da levedura inoculada, sendo a fase estacionária atingida aproximadamente após 48 h.

Passadas 96 h dos tratamentos, as amostras foram novamente plaqueadas para repetição da contagem de unidades formadoras de colónias. Na Figura 31 são apresentadas duas imagens correspondentes a esse momento de amostragem.

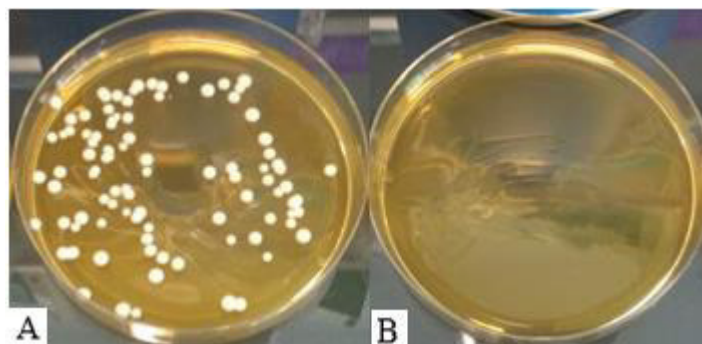


Figura 31. Amostra de controlo, em diluição 1: 10 000 000 (A) e de tratamento em pulso (B), por diluir.

Apesar de não ser observável nenhuma alteração até este ponto, pela análise da absorvância das amostras tratadas, nem todas refletiram este comportamento: em algumas amostras correspondentes com campo elétrico houve uma elevada disparidade entre os triplicados realizados, sendo que a hipótese de contaminações cruzadas afetou os resultados, como refletido nos valores de concentração celular correspondentes ao momento de amostragem seguinte, às 162 h. Estes valores foram considerados como resultado de fatores externos, não sendo significativos para a estabilidade dos tratamentos.

Na Figura 32 são apresentados os matrizes contendo amostras correspondentes ao tratamento em pulso, após 162 h de incubação.



Figura 32. Avaliação do crescimento microbiano a olho nu.

É possível observar que o matraz da direita se encontra bastante mais turvo que os restantes, facto quantificável pela leitura da absorvância e que explica o desvio padrão apresentado na Figura 30. Com base nestes resultados é possível concluir que o crescimento microbiano pode ser monitorizado de forma indireta pela turbidez das amostras.

Após 21 dias de incubação, as amostras dos tratamentos mantêm a sua tendência de estabilidade, sem que nenhum dos matrizes apresente sinais de turbidez ou formação de depósito. Assim, no “pior dos cenários”, os tratamentos permitem uma redução de 5 a 7 ciclos logarítmicos da concentração de leveduras, refletindo uma estabilidade mínima de

90 h, mesmo em condições favoráveis para o crescimento da levedura e com tratamentos elétricos bastante rápidos (< 60 s).

Devido ao volume de mosto a tratar em ambiente industrial e as condições de higiene requeridas, os tratamentos poderão ser uma medida eficaz para o controle das leveduras de degradação nos mostos.

4.6 Avaliação da viabilidade de implementação da tecnologia em escala industrial

De forma a avaliar se a utilização de OH é possível em escala industrial, foram consideradas três componentes principais: os custos energéticos associados a estes tratamentos, a existência de equipamentos apropriados para o processo e a aceitabilidade dos consumidores para adquirir um vinho sem sulfitos.

4.6.1 Cálculo da energia gasta durante o tratamento

Uma vez que o tratamento de maior interesse comercial consiste na aplicação de um pulso até o mosto atingir 90 °C, foi com base neste perfil de aquecimento que se estimou o gasto energético. A potência (P), em cada instante, foi calculada pela Equação 11, através da relação entre a intensidade da corrente e a voltagem aplicada.

$$\frac{P}{\text{J s}^{-1}} = \frac{V}{\text{V}} \times \frac{I}{\text{A}} \quad \text{Equação 11}$$

A voltagem aplicada foi contante e igual a 103.2 V, sendo a amplitude medida com recurso ao osciloscópio. Representando graficamente a potência, em função do tempo, obteve-se o gráfico ilustrado na Figura 33.

Efetuada uma regressão linear, é possível verificar que os pontos experimentais se ajustam a uma reta (ajuste com coeficiente de determinação de 0.9925). Assim, ao invés de integrar a expressão matemática que relaciona as duas grandezas, é possível obter um valor aproximado calculando a área do triângulo formado pelos pontos iniciais e finais.

Dessa forma, foi atingido o valor de 3 068.3 J para um aquecimento entre 30 °C e 90 °C, aplicado a uma amostra de 10 mL de mosto. Considerando um aumento de escala

ideal, seriam necessários 306 830 J para efetuar o mesmo aquecimento a 1 L do composto, correspondendo a 0.853 kWh.

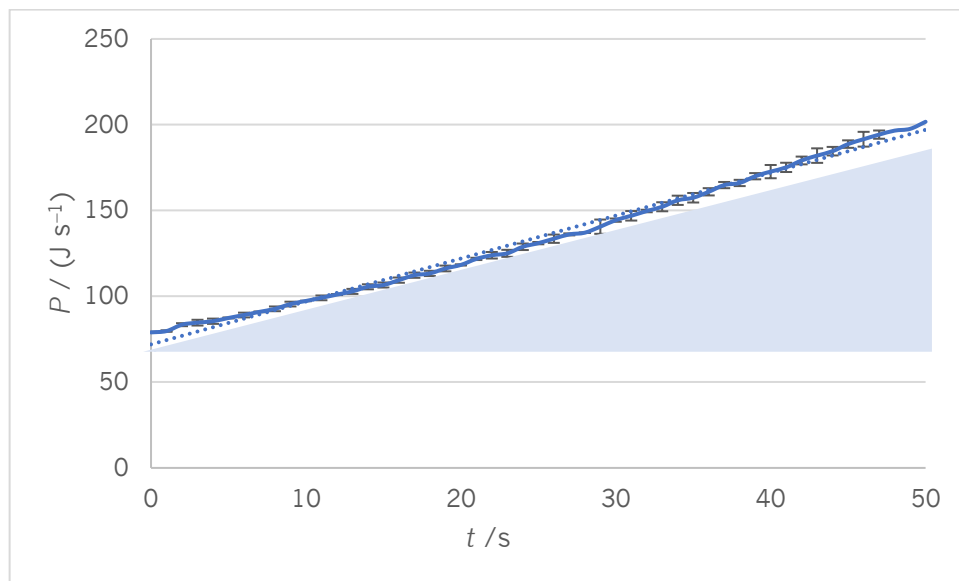


Figura 33. Variação da potência ao longo do tratamento.

Considerando que a empresa com maior quota de mercado em Portugal, EDP, cobra uma média de 0.1659 € por kWh (para tarifa simples), o custo estimado para o OH a 1 L de mosto ronda os 0.14 €. O processo de remoção de SO₂ usado tradicionalmente tem um custo médio de 0.05 € L⁻¹ de mosto tratado, ao qual se somam os custos do SO₂ adicionado ao mosto (dependentes do produto utilizado e da concentração microbiana inicial do mosto), que rondam os 0.01 € L⁻¹.

Assim, considera-se que o custo de operação do tratamento óhmico não é desencorajador quando comparado com seu concorrente já implementado.

4.6.2 Possibilidades de implementação da tecnologia

Para implementar a tecnologia na indústria, há a possibilidade de usar as próprias cubas de armazenamento do mosto como reator óhmico ou possuir uma unidade de tratamento individualizada, ligada aos restantes equipamentos por tubagens.

A transformação das cubas em reatores óhmicos permite prevenir contaminações associadas a trasfegas e manuseamento do produto, uma vez que este nunca contacta com o exterior. Além disso, é possível associar à instalação de elétrodos nas várias cubas um

módulo de controlo e geração de sinal, transportável, que pode ser associado ao reator óhmico a utilizar. Uma vez que algumas cubas usadas para fermentação e armazenamento possuem camisa de arrefecimento incorporada, é possível aplicar a tecnologia por pulsos sucessivos, diminuindo a temperatura entre os tratamentos de modo a melhor conservar as propriedades do mosto.

A segunda opção de implementação consiste num reator óhmico, a operar em contínuo, ao qual vai sendo alimentado o mosto a tratar. Procedendo à encomenda do reator a uma empresa especializada, há a possibilidade de especificar o número, tipo e posicionamento dos eléctodos, tipo de agitação e fluxo do líquido.

Na Figura 34 apresenta-se um exemplo deste tipo de reatores, à escala piloto, produzido pela empresa C-Tech Innovation, que permite o aquecimento de líquidos numa taxa até 300 kg h^{-1} .



Figura 34. Reator óhmico à escala piloto (“C-Tech Innovation,” 2018).

4.6.3 Estudo de mercado

Apesar de serem poucas as hipóteses, o mercado português já apresenta algumas alternativas para os consumidores que desejam um produto sem adição de sulfitos.

A primeira empresa a produzir este tipo de produto foi a Casa Agrícola Roboredo Madeira, que desde 2011 apresenta os seus vinhos “SO₂ Free”: vinhos brancos e tintos de Denominação de Origem Controlada Douro, vinificados sem adição de sulfuroso. Estes vinhos encontram-se à venda por 14.60 € a garrafa, o dobro dos seus semelhantes contendo sulfitos produzidos pela mesma empresa.

Na mesma altura, a empresa Encosta da Quinta, Lda., situada na região demarcada de Óbidos, lançou no mercado os vinhos *Humus* nas variedades branco, tinto e rosé. Estes vinhos são resultantes da fermentação espontânea das uvas, sendo que apenas no vinho branco não há adição de sulfuroso durante o processo.

Em 2017 o método de produção estendeu-se à região dos Vinhos Verdes, com a produção do primeiro vinho Alvarinho sem adição de sulfitos, o *Soalheiro Nature "Pur Terroir"*, da Quinta do Soalheiro. Este vinho, além da isenção de sulfitos, é produzido sem filtração e utilizando as leveduras nativas das uvas para realizar as fermentações alcoólica e malolática que o caracterizam. Cada garrafa deste vinho é vendida a 14.90 €, enquanto que o Alvarinho tradicional da mesma marca ronda os 8.90 €.

Com base nestes dados é possível concluir que os consumidores estão recetivos ao produto idealizado, o Vinho Verde branco estabilizado sem a presença de sulfitos, mesmo que esta característica leve a um aumento do valor a pagar. Assim, tornam-se desprezáveis os 0.10 € de diferença por litro, entre os dois métodos de inativação de microrganismos de decomposição, sendo o OH uma alternativa a considerar no processo vinificação, correspondendo aos desejos dos consumidores por produtos sem adição de químicos e mais amigos do ambiente.

Nestes casos, o processo de marketing passa pela divulgação, de forma inequívoca, da ausência de sulfitos no vinho, como demonstrado pelo rótulo apresentado na Figura 35.



Figura 35. Rótulo do vinho Carm SO₂ Free Tinto, colheita de 2011.

Com base nestes valores, considera-se que o mercado será recetivo a vinhos produzidos sem a adição de sulfitos ou outros compostos químicos, estando os consumidores dispostos a pagar mais por um produto que cumpra estas características. Ações de sensibilização da população geral quanto aos efeitos negativos do SO₂ na saúde serão um ponto essencial para combater a tradição de aplicação deste composto químico.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES FUTURAS

5.1 Principais conclusões do trabalho prático

É importante realçar a elevada variabilidade existente entre as amostras de diferentes lotes de mosto de Vinho Verde branco, quer na sua aparência quer nos parâmetros físico-químicos caracterizados, o que de alguma forma dificultaram a interpretação e uniformidade dos resultados.

Na componente microbiológica das amostras foi verificada uma discrepância entre lotes, havendo uma maioria na qual as colónias de *H. uvarum*, *P. membranifaciens* e *P. anomala* são as espécies identificadas com mais frequência. Nesse tipo de lotes, as amostras iniciam a fermentação poucas horas após o seu descongelamento e, após essa etapa de reação, a microbiologia sofre alterações, havendo uma diminuição drástica nas percentagens de fungos filamentosos e *P. anomala* detetadas. Nos restantes lotes, há a presença de colónias de *S. pombe* e espécies distintas de todas as descritas na literatura, que não causam a alteração do corante presente no meio. Nestas amostras a fermentação é tardia ou inexistente e os microrganismos apresentam uma fase de latência mais longa que os restantes.

Em vários casos foram detetadas colónias que se acredita serem de origem bacteriana, frequentemente em situações de competição com as leveduras, uma vez que, quando apenas ocorre uma inativação parcial destas, as bactérias apresentam-se em maior concentração relativa, em relação ao controlo.

Em nenhuma amostra de mosto foi comprovada a presença natural de *Dekkera/Brettanomyces* nem de *S. cerevisiae*, mesmo após a fermentação espontânea do mosto.

A nível de aplicação da tecnologia de Aquecimento Óhmico por aplicação de Campos Eléctricos Moderados, foi comprovado que, apesar da variabilidade entre as amostras de mosto estudadas, todas elas são passíveis de ser aquecidas num reator óhmico. Nesse tipo de tratamento, é possível atingir uma temperatura de 90 °C num quinto do tempo, quando comparado com o aquecimento convencional em banho.

Os tratamentos a temperaturas inferiores a 65 °C não se mostraram capazes de inativar a totalidade dos microrganismos presentes mas, em todos os casos estudados, com um

aumento de temperatura tão ténue como 3 °C, ocorre uma diminuição da carga microbiana em relação à amostra não tratada.

Comparando os tratamentos realizados na presença de campos elétricos moderados com os seus equivalentes sem campo elétrico, não é possível concluir que este tenha um efeito adicional na inativação dos microrganismos, sendo necessária a realização de mais estudos nesse sentido.

Os tratamentos em condições de binómios de pasteurização por OH permitem a inativação total das leveduras e bactérias presentes nas amostras que, quando mantidas sob refrigeração num ambiente assético, se mantêm estáveis por 28 dias.

É possível uma otimização aos binómios de pasteurização longa com temperaturas mais baixas, uma vez que 15 min são suficientes para uma redução total da carga microbiana, sendo dispensáveis os 30 min convencionalmente utilizados.

Na sua generalidade, os tratamentos de OH não levam a alterações indesejadas nos parâmetros de pH, AR, TP, [O₂], AT ou SST das amostras.

Nos tratamentos com culturas puras de *Dekkera bruxellensis*, os ensaios de aquecimento óhmico a 90 °C por 1 s mostraram ser capazes de diminuir a concentração de leveduras em 5 ciclos logarítmicos, mantendo uma estabilidade mínima de 4 dias a temperatura ambiente, sob agitação.

A nível de implementação industrial, é possível atingir a estabilidade do mosto recorrendo a tratamentos menos agressivos no OH do que no método tradicional de sulfitação. Este método permite, ainda, uma diminuição dos resíduos gerados durante o processo, além de permitir uma elevada flexibilidade operacional, mostrando ser uma alternativa viável.

Com base no estudo económico realizado, os custos adicionais provenientes da utilização do OH não são impeditivos, quando comparados com o interesse e disponibilidade económica dos consumidores para adquirir produtos sem adição de sulfitos.

5.2 Perspetivas para desenvolvimentos futuros

No futuro, recomenda-se a utilização de meios complementares de caracterização microbiológica de forma a realizar uma caracterização mais aprofundada das espécies de leveduras e bactérias presentes nas uvas, bem como as suas percentagens relativas. Assim, a primeira sugestão passa pelo uso de propionato, de forma a inibir o crescimento de bolores; estreptomicina, um composto que inibe as bactérias ácidas lácticas, mas ao qual são resistentes as bactérias acéticas; cicloheximida, de forma a que sobressaíam as colónias de *Dekkera/Brettanomyces*, bem como o uso de meios complementares ao WL, indicados para a contagens de bactérias.

A segunda recomendação recai sobre os ensaios de inativação, sendo que, nos casos de culturas puras, seria interessante a realização de curvas clássicas de morte térmica, de forma a otimizar a duração necessária dos tratamentos e averiguar de uma forma consistente eventuais efeitos elétricos na inativação microbiológica.

Além disso, é essencial a realização de um aumento de escala, com acompanhamento dos parâmetros físico-químicos do mosto ao longo do tempo, bem como da população microbiana presente. Nos casos em que o tratamento for realizado com sucesso, o mosto deve ser inoculado e submetido a microvinificação, de forma a avaliar o impacto do método as características sensoriais e de estabilidade do vinho resultante,

Para melhor compreender a influência do campo elétrico no crescimento das leveduras de degradação do vinho, é sugerida a utilização de campos elétricos mais elevados, estudos mais aprofundados a baixas frequências e o uso de diferentes tecnologias, como os campos elétricos pulsados.

Em último lugar, recomenda-se que os resultados sejam transpostos para Vinho Verde Tinto, avaliando se é possível a implementação da tecnologia em todos os produtos produzidos pela empresa.

BIBLIOGRAFIA

- ASAE (2018). ASAE- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Retrieved May 25, 2018, from <http://www.asae.gov.pt/>
- C-Tech Innovation (2018). Retrieved from <https://www.ctechinnovation.com/tag/qulom/>
- Cantos-Villar, E., & Guerrero, R. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine : A parameter review, *42*.
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*, *181*, 75–83.
- Castro, I., Macedo, B., Teixeira, J., & Vicente, A. (2004). The Effect of Electric Field on Important Food-processing Enzymes: Comparison of Inactivation Kinetics under Conventional and Ohmic Heating. *Journal of Food Science C: Food Chemistry and Toxicology*, *69*(9), C696–C701.
- Cavazza, A., Grando, M., & Zini, C. (1992). Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. *Vignevini*, *9*(January 1992).
- Chavarria, G., Dos Santos, H., Zanús, M., Zorzan, C., & Marodin, G. (2008). Caracterização físico-química do mosto e do vinho Moscato Giallo em videiras cultivadas sob cobertura de plástico. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *43*(7), 911-916.
- Cho, H., Yousef, A., & Sastry, S. (1996). Growth kinetics of *Lactobacillus acidophilus* under ohmic heating. *Biotechnology and Bioengineering*, *49*(3), 334-340.
- Climaco, P., Silva, J., Laureano, O., Castro, R., & Tonietto, J. (2012). O Clima Vitícola das Principais Regiões Produtoras de Uvas para Vinho de Portugal. CYTED.
- Couto, J., Neves, F., Campos, F., & Hogg, T. (2005). Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, *104*(3), 337–344.
- CVRVV. (2015). Regulamento de Produção e Comércio da DO Vinho Verde | Versão Consolidada 13.06.2015 DJ CVRVV.
- CVRVV. (2018). Portal do Vinho Verde. Retrieved May 9, 2018, from <http://portal.vinhoverde.pt/pt/estatisticas#!>
- Da Silva, M., Tecchio, M., Moura, M., Brunelli, L., Imaizumi, V., & Filho, W. (2015). Composição físico-química do mosto e do vinho branco de cultivares de videiras em resposta a porta-enxertos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *50*(11), 1105–1113.
- Deveze, M., & Ribereau-Gayon, P. (1977). Thermoresistance des levures dans le vin - Application a la stabilisation biologique des vins par la chaleur. *Connaissance Vigne Vin*, *11*(2), 131–163.
- Divol, B., Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide : strategies developed by wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, *95*, 601–613.

- Escott, C., Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M., & Suárez-Lepe, J. A. (2017). Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy. *Yeast - Industrial Applications*, (November).
- Fabrizio, V., Vigentini, I., Parisi, N., Picozzi, C., Compagno, C., & Foschino, R. (2015). Heat inactivation of wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by hot water treatment. *Letters in Applied Microbiology*, *61*(2), 186–191.
- FAO. (2007). Code of Practice for the Prevention and Reduction of Ochratoxin A Contamination in Wine, 1–6.
- FAO, & WHO. (2016). Discussion Paper on the Use of Food Additives in the Production of Wine, 1–10.
- Flamini, R., & Vedova, A. D. (2007). Preservation of cabernet sauvignon grape must samples destined for chemical analysis: Addition of sodium azide, allyl isothiocyanate, octanoic acid and ethyl bromoacetate, and effect of pasteurization. *Journal of Food Processing and Preservation*, *31*(3), 345–355.
- Fugelsang, K. , & Edwards, C. (2007). *Wine microbiology: Practical applications and procedures. Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*.
- Grazietti, A. (2006). Aplicações Enológicas do Dimetildicarbonato. *Vignevini*, 1–7.
- Horsey, I. (2007). *The Chemistry and Biology of Winemaking*. The Royal Society of Chemistry.
- Infovini. (2009). Infovini - O portal do vinho português. Retrieved from <http://www.infovini.com/>
- IVV. (2018). Instituto da Vinha e do Vinho - IVV. Retrieved from <http://www.ivv.gov.pt>
- Jackson, R. (2008). *Wine Science - Principles and Applications* (Third). Elsevier.
- Jaeger, H., Roth, A., Toepfl, S., Holzhauser, T., Engel, K., Knorr, D., Steinberg, P. (2016). Opinion on the use of ohmic heating for the treatment of foods. *Trends in Food Science and Technology*, *55*, 84–97.
- Jolly, N., Varela, C., & Pretorius, I. (2014). Not your ordinary yeast: Non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, *14*(2), 215–237.
- Kántor, A., Mareček, J., Ivanišová, E., Terentjeva, M., & Kačániová, M. (2017). Microorganisms of grape berries. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*, *71*(6), 502–508.
- Kaur, N., & Singh, A. (2016). Ohmic Heating: Concept and Applications—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(14), 2338–2351.
- König, H., Uden, G., & Fröhlich, J. (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer.
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1–2), 23–50.
- Machado, L., Pereira, R., Martins, R., Teixeira, J., & Vicente, A. (2010). Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature. *Journal of Food Engineering*, *96*(4), 520–527.

- Machado, M. (2011). *Modernização do Ciclo de Vida do Vinho Verde e da Rolha de Cortiça Natural por Utilização do SimaPro recorrendo a vários Métodos de Avaliação de Impactes Ambientais*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Meireles, A. (2013). *Controlo de Maturação e Clarificação do Mosto*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Micha, P., & Corradini, M. (2011). Microbial growth curves: What the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(10), 917–945.
- Morais, E. (2012). *Inactivação térmica de diferentes espécies de leveduras de alteração de vinhos*.
- OIV. (2018). International Organisation of Vine and Wine. Retrieved from <http://www.oiv.int/en/>
- Oliveira, J.(2000). *Aromas Varietais e de Fermentação Determinantes da Tipicidade das Castas Loureiro e Alvarinho*. Universidade do Minho.
- Padilla, B., Gil, J., & Manzanares, P. (2016). Past and future of non-Saccharomyces yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–20.
- Pataro, G., Barca, G., Pereira, R., Vicente, A., Teixeira, J., & Ferrari, G. (2014). Quantification of metal release from stainless steel electrodes during conventional and pulsed ohmic heating. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, 66–73.
- Pereira, R., Martins, J., Mateus, C., Teixeira, J., & Vicente, A. (2007). Death kinetics of Escherichia coli in goat milk and Bacillus licheniformis in cloudberry jam treated by ohmic heating. *Chemical Papers*, 61(2), 121–126.
- Pereira, R., Pereira, M., Teixeira, J., & Vicente, A. (2007). Comparison of chemical properties of food products processed by conventional and ohmic heating. *Chemical Papers*, 61(1), 30–35.
- Pina, L. A. (2010). *Pegada da de água associada à produção do vinho verde branco*. Universidade de Aveiro.
- Pinto, J. (2015). *Implementação do sistema HACCP a uma empresa de Frutas e Vinhos*.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006a). *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition. Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition* (Vol. 2).
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006b). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications. Handbook of Enology* (Vol. 2).
- Samaranayake, C., Sastry, S., & Zhang, H. (2005). Pulsed Ohmic Heating—A Novel Technique for Minimization of Electro- chemicalchemical Reactions During Processing. *Journal of Food Science*, 70(8), 460–465.
- Santos, P., & Rodrigues, R. (2018). Electric field-based technologies for valorization of bioresources. *Bioresource Technology*, 254(March), 325–339.

- Silva, R. (2017). Sistemas de certificação da segurança alimentar : do HACCP ao FSSC 22000. *Publindústria*, 127.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. (2015). Brettanomyces yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24–38.
- Teixeira, J., Vicente, A., Castro, I., & Pereira, R. (2012). Ohmic Heating for Food Processing. In *Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues* (pp. 459–499).
- Vinho Verde Wine Fest. (2018). Retrieved from <http://vinhoverdewinefest.com/>
- Viticulture & Enology. (2016). Retrieved from ineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast
- Zhang, Q., Du, J., Jin, Y., Zhao, Z., & Li, Y. (2013). SO₂ reduction in distilled grape spirits by three methods. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(4), 314–320.
- Zuehlke, J., Petrova, B., & Edwards, C. (2013). Advances in the Control of Wine Spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 57–78.

ANEXO I – COMPOSIÇÃO DO MEIO WL

Composto	g L⁻¹
Glucose	50.0
Agar	12.0
Peptona	5.0
Extrato de levedura	4.0
KH ₂ PO ₄	0.6
KCl	425.0 × 10 ⁻³
CaCl ₂	125.0 × 10 ⁻³
MgSO ₄	125.0 × 10 ⁻³
Verde de Bromocresol	22.0 × 10 ⁻³
FeCl ₃	2.5 × 10 ⁻³
MnSO ₄	2.5 × 10 ⁻³