

**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Bruno Miguel Oliveira Carneiro

**Preservação de mostos de uvas brancas:  
alternativas ao dióxido de enxofre**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica  
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob orientação do  
**Professor Doutor José Maria Marques Oliveira**  
e do  
**Professor Doutor António Augusto Martins de Oliveira  
Soares Vicente**

e supervisão na empresa do  
**Engenheiro Guilherme Paulo Dias de Castro Pereira**

## **Declaração**

Nome: Bruno Miguel Oliveira Carneiro

Título da dissertação:

Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre

Orientadores:

José Maria Marques Oliveira

António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente

Supervisor na empresa:

Guilherme Paulo Dias de Castro Pereira

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado:

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo Tecnologia Química e Alimentar

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura:\_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Engenheiro Guilherme Pereira por todo o conhecimento transmitido, por me fazer sentir bem-vindo na empresa e por todo o tempo em que me esteve a ajudar a perceber o mundo do trabalho.

Queria agradecer também ao professor Dr. José Maria Oliveira e ao professor Dr. António Vicente pela sua orientação, por toda a ajuda que me deram e por toda a atenção despendida ao esclarecer as minhas dúvidas.

Queria agradecer também à Doutora Genisheva Zlatina e Doutora Joana Martins pela ajuda que me deram ao relembrar alguns conceitos relativos à parte da microbiologia.

Agradecer à Sónia Leite por me ter ensinado a fazer inúmeras análises aos vinhos, por me tratar sempre bem e me ajudar a ser um melhor profissional.

Aos meus pais, irmã e avós, que tanto sacrificaram para que eu pudesse concluir o curso, sempre me apoiando e transmitindo confiança e orgulho, tentando sempre dar os melhores conselhos.

À minha namorada pela paciência que teve para os momentos menos bons, para a distância, mas acima de tudo pelo apoio em todas as etapas.

Aos irmãos da UM, amigos de sempre e para sempre! Obrigado por estes 5 anos espetaculares que sem vocês não faria qualquer sentido! Ao Rafael, Cátia, Margarida, Mariana, Cristina, Joana, Juliana, Natália, Carolina e Ana Isabel.

Aos meus amigos fafenses que nem com a distância deixaram de me apoiar e ajudar sempre que eu precisava!

Por fim, mas não menos importante gostava de agradecer a todos os que fizeram parte desta viagem, que de uma maneira ou de outra me fizeram chegar até aqui, me fizeram ser quem sou! A todos, um enorme obrigado!



## Sumário

A produção de vinho é nos dias de hoje algo que para a maioria das pessoas já está estabelecido e dominado. No entanto, existem constantes preocupações ligadas a este processo, sendo uma delas a redução dos produtos químicos usados para a estabilização microbiana, tornando assim o processo mais “verde” relativamente ao nível de processamento empregado e mais preocupado com a saúde dos consumidores. Tendo em conta este objetivo, a empresa Vinhos Norte tentou inovar e utilizar métodos alternativos para a conservação do mosto, feita habitualmente pela adição de dióxido de enxofre.

Como o estágio decorreu muito após as vindimas não foi possível usar mosto “fresco”, tendo sido usado mosto amuado com dióxido de enxofre. Este mosto sofreu um processo de remoção do dióxido de enxofre, através da adição de peróxido de hidrogénio. Com vista nesse objetivo, foi estudado o perfil da redução do dióxido de enxofre e alguns efeitos que a sua adição poderiam causar, como a redução da acidez e a formação de ácido sulfúrico. Ao aplicar o peróxido de hidrogénio denota-se uma rápida descida da concentração de  $\text{SO}_2$ . No entanto, não se deteta uma formação excessiva de ácido sulfúrico.

O método alternativo em estudo foi a radiação ultravioleta. Foram efetuadas passagens de mosto a fermentar por um aparelho de radiação ultravioleta. Foram feitas alterações do caudal, de forma a determinar em que sentido o tempo de retenção afeta a eficácia da radiação na eliminação de leveduras. O emprego da radiação ultravioleta permitiu perceber que dois dos fatores-chave da aplicação são a turbulência do líquido e o tempo de contacto que este tem com a radiação ultravioleta. Este estudo, embora muito limitado pelo aparelho usado, revela uma diminuição da carga microbiana presente no mosto a fermentar. Esta situação permite especular que melhorando as condições seria possível ter um decréscimo maior no número de microrganismos viáveis. Este método pode ter potencial para ser utilizado em futuras aplicações.

No sentido de estudar a eficácia da radiação ultravioleta, fez-se uma investigação de uma possível implementação de um laboratório de microbiologia. Foi feita uma planificação de um laboratório de microbiologia que permitiria fazer análises simples, mas importantes para o estudo da eficácia da radiação ultravioleta. A implementação do laboratório não foi realizada, por falta de tempo e devido à empresa estar a atravessar uma mudança na sua estrutura interna, com novos mercados e uma constante procura para satisfazer todos os seus clientes. Foram adquiridos a câmara de Neubauer, e o corante, possibilitando assim um estudo da inativação de leveduras através de contagem microscópica.

**Palavras-chave:** Radiação ultravioleta, peróxido de hidrogénio, mosto, uvas brancas, dióxido de enxofre.



## **Abstract**

For most people nowadays wine production is something that is already established and mastered. However, there are continuing concerns involved in this process, one of them being the reduction of the chemicals used for microbial stabilization, thereby making the process "greener" in terms of the consumer's health and processing level. Given this objective, the Vinhos Norte Company tried to innovate and use alternative methods for the conservation of grape must, usually made by adding sulfur dioxide.

As the training period took place well after the harvest it was not possible to use "fresh" must, instead it was used must preserved with high amounts of sulfur dioxide. This grape must undergo a process of sulfur dioxide removal by addition of hydrogen peroxide. With a view in this objective, it was studied the profile of the reduction of sulfur dioxide and some effects that this addition could cause, such as the reduction of acidity and the formation of sulfuric acid. By applying hydrogen peroxide it was noted a rapid decrease of the concentration of SO<sub>2</sub>. However, it was not detected a excessive formation of sulfuric acid. The alternative method under study was the ultraviolet radiation. It was made passages of fermenting must by the ultraviolet radiation device. Flow changes were made in order to determine in which way the retention time affects the effectiveness of the radiation in eliminating yeast.

The use of ultraviolet radiation permitted to understand that two of the implementation key factors are the cloudiness of the liquid and the time that it's subjected to ultraviolet radiation. This study, although limited by the device used, shows a decrease of microbial load present in the fermenting must. This allows to speculate that by improving conditions it would be possible to have a greater decrease in the number of viable microorganisms. This method may have the potential to be used in future applications

In order to study the effectiveness of ultraviolet radiation, it was made an investigation of a possible implementation of a microbiology laboratory. It was made a planning of a microbiology laboratory which would allow the realization of simple but important analyzes to the study of the effectiveness of ultraviolet radiation. The implementing of the lab was not accomplished due to lack of time and because of the company is undergoing a change in its internal structure, with new markets and a constant search to satisfy all its customers. It was purchased a Neubauer chamber, and the dye, allowing a study of inactivation of yeast through microscopic counting.

**Key-words:** Ultraviolet radiation, hydrogen peroxide, grape must, white grapes, sulfur dioxide.



<b>Agradecimentos</b> .....	iii
<b>Sumário</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>Índice</b> .....	ix
<b>Índice de figuras</b> .....	xiii
<b>Índice de tabelas</b> .....	xv
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	xvii
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>1.1. Motivação e objetivos</b> .....	1
<b>1.2. A empresa: Vinhos Norte</b> .....	2
<b>1.3. Organização da dissertação</b> .....	2
<b>2. Fundamentação teórica</b> .....	5
<b>2.1. O vinho</b> .....	5
2.1.1. Fermentação alcoólica.....	8
2.1.2. Fermentação maloláctica.....	10
<b>2.2. Microrganismos presentes no mosto/vinho</b> .....	11
2.2.1. Leveduras .....	11
2.2.2. Bactérias do Ácido Láctico.....	16
2.2.3. Bactérias do Ácido Acético.....	19
2.2.4. Controlo microbiológico .....	21
<b>2.3. Meios de preservação do mosto</b> .....	22
2.3.1. Meio atual de preservação: Dióxido de enxofre .....	22
2.3.2. Meio alternativo de preservação: Radiação Ultravioleta.....	24

<b>2.4. Supressão do dióxido de enxofre</b> .....	26
2.4.1. Peróxido de Hidrogénio.....	26
<b>3. Metodologias</b> .....	31
<b>3.1. Estudo da aplicação do peróxido de hidrogénio</b> .....	32
<b>3.2. Inoculação do mosto</b> .....	32
<b>3.3. Contagem Celular</b> .....	33
<b>3.4. Processamento através de radiação ultravioleta</b> .....	33
<b>3.5. Estrutura das experiências</b> .....	35
<b>4. Resultados e discussão</b> .....	37
<b>4.1. Laboratório de microbiologia</b> .....	37
4.1.1 Listagem dos materiais necessários.....	37
4.1.2. Listagem dos materiais existentes.....	37
4.1.3. Listagem dos materiais a requerer .....	38
4.1.4. Orçamento .....	38
4.1.5. Materiais adquiridos .....	39
<b>4.2. Estudo da aplicabilidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na anulação do SO<sub>2</sub></b> .....	40
<b>4.3. Validação microbiológica</b> .....	43
<b>4.4. Estudo dos caudais</b> .....	43
<b>4.5. Quantificação microbiológica</b> .....	44
<b>4.6. Cálculo da dosagem da radiação ultravioleta</b> .....	48
<b>5. Conclusões</b> .....	51
<b>Bibliografia</b> .....	53
<b>Anexos</b> .....	61
<b>Anexo 1: Medição da Acidez Total</b> .....	62
<b>Anexo 2: Validação microbiológica</b> .....	63
<b>Anexo 3: Utilização da Câmara de Neubauer</b> .....	64

<b>Anexo 4: Procedimento para a medição da concentração de SO<sub>2</sub> Livre e Total</b> .....	66
<b>Anexo 5: Exemplo de cálculo para a dessulfitação do mosto.</b> .....	67
<b>Anexo 6: Mapa de controlo de fermentação</b> .....	69
<b>Anexo 7: Compilação de orçamentos requeridos</b> .....	70
<b>Anexo 8: Relatório do estudo da concentração de sulfatos no mosto dessulfitado com peróxido de hidrogénio</b> .....	77
<b>Anexo 9: Exemplo de cálculo de contagem através da câmara de Neubauer</b> .....	78
<b>Anexo 10: Cálculo da Intensidade, dosagem e dosagem por volume</b> .....	79



## Índice de figuras

Figura 1: Logótipo da empresa Vinhos Norte. ....	2
Figura 2: Rótulo presente nos rótulos das garrafas de vinho verde (CVRV, 2015). ....	6
Figura 3: Esquema dos processos de vinificação. ....	7
Figura 4: Perfil geral da concentração de glucose e frutose no mosto ( $C$ ) ao longo do tempo ( $t$ ), (Adaptado de Rodicio & Heimisch, 2009). ....	9
Figura 5: Perfil generalizado do crescimento durante uma fermentação com microflora natural. [A] leveduras não <i>Saccharomyces</i> ; [B] <i>Saccharomyces</i> ; [C] <i>Oenococcus oeni</i> ; [D] leveduras/bactérias que podem deteriorar o vinho (Adaptado de Fugelsang & Edwards, 2007). ....	10
Figura 6: Ciclo de crescimento de leveduras representada a concentração celular ( $N$ – número de células) ao longo do tempo ( $t$ ). a: fase de latência; b: fase exponencial; c: fase estacionária; d: fase de declínio (Adaptado de Zamora, 2009). ....	13
Figura 7: Comparação entre populações ( $N$ – número de células ao longo do tempo). Sendo a população de leveduras a linha a cheio e símbolos a cheio, eixo do lado direito e de BAA a linha a tracejado e símbolo aberto, eixo do lado esquerdo em fermentações inoculadas (triângulo) e espontânea (quadrado) (Adaptado de Guillamón & Mas, 2009). ....	21
Figura 8: Gráfico que ilustra a quantidade ( $S$ ) de cada forma do dióxido de enxofre presente de acordo com valores de pH (Adaptado de Fugelsang & Edwards, 2007). ....	23
Figura 9: A interação de $SO_2$ com peróxido de hidrogênio e quinonas após oxidação de catecol, evitando assim a oxidação do etanol pela reação Fenton (Adaptado de Elias et al., 2010). ....	27
Figura 10: Esquema das etapas realizadas para a elaboração da dissertação. ....	31
Figura 11: A- Aparelho de ultravioleta (Retirado de Pure Water Products). B- Recipiente de receção do mosto antes de ir para o aparelho de UV. ....	33
Figura 12: Regulador e torneira. ....	34
Figura 13: Desenho técnico da vista superior da torneira. A- posição 0; B- posição 1; C- posição 2; D- posição 3. ....	34
Figura 14: Esquema utilizado para as experiências com a radiação ultravioleta. ....	35
Figura 15: Esquemática da estrutura das experiências realizadas. ....	36
Figura 16: Variação da concentração de $SO_2$ Total ( $C_{SO_2total}$ ) no processo de remoção pelo $H_2O_2$ . ....	40
Figura 17: Variação da concentração de $SO_2$ Combinado ( $C_{SO_2combinado}$ ). ....	41

Figura 18: Variação da concentração de SO <sub>2</sub> Livre ( $C_{SO_2, livre}$ ).....	41
Figura 19: Evolução da acidez Total ( $AT_{acidant}$ ) e do pH para os ensaios de remoção do SO <sub>2</sub> com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ...	42
Figura 20: Placa de Petri, inoculada com mosto, sem diluição.....	43
Figura 21: Evolução da concentração celular ( $M$ ) no estudo do efeito dos raios UV.....	46
Figura A. 1: Preparação das diluições e inoculações (Adaptado de OIV, 2013).....	63
Figura A. 2: Câmara de Neubauer ou Hematocítmetro (Adaptado de Diaz, 2015). ....	64
Figura A. 3: Informações sobre o mosto/vinho em fermentação. ....	69
Figura A. 4: Acompanhamento da fermentação.....	69
Figura A. 5: <i>Print Screen</i> da proposta da empresa A. ....	70
Figura A. 6: <i>Print Screen</i> do <i>site</i> da empresa B. ....	71
Figura A. 7: <i>Print Screen</i> da proposta da empresa B. ....	72
Figura A. 8: <i>Print Screen</i> da proposta da empresa C. ....	73
Figura A. 9: <i>Print Screen</i> da proposta da empresa C. ....	74
Figura A. 10: <i>Print Screen</i> da proposta da empresa D. ....	75
Figura A. 11: <i>Print screen</i> do <i>site</i> da empresa E.....	75
Figura A. 12: <i>Print screen</i> do <i>site</i> da empresa E.....	76
Figura A. 13: Digitalização do relatório do estudo da concentração de sulfatos.....	77

## Índice de tabelas

Tabela 1: Somatório dos materiais necessários, indicando o fornecedor, preço ( $P$ ) e quantidade.....	39
Tabela 2: Tabela dos resultados do caudal ( $Q$ ) e tempo de retenção hidráulica ( $\tau$ ) para 1,5 voltas, 1,75 voltas e 2 voltas e para as respectivas 3 posições relevantes .....	44
Tabela 3: Tabela que demonstra os valores de absorvância média de dois ensaios a 254 nm e 520 nm ( $Abs_{med}$ ) de acordo com o comprimento de onda ( $\lambda$ ) usado na lâmpada UV da experiência 2.....	45
Tabela 4: Resultados da dosagem por unidade de área ( $D$ ) e dosagem por volume ( $D_w$ ) da radiação UV para cada experiência.....	48
Tabela A1: Lista de ingredientes e quantidades para fazer o meio YPD .....	63



## Lista de abreviaturas

SGC: Sistema de Gestão e Qualidade

HACCP: *Hazard Analysis and Critical Control Points* (Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos)

BAL: Bactérias do ácido láctico

BAA: Bactérias do ácido acético

NADPH: Fosfato Dinucleótido de nicotinamida e adenina

ATP: Adenosina Trifosfato

NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina

ADP: Adenosina Difosfato

TCA: ciclo dos ácidos tricarboxílicos

RNA: Ácido Ribonucleico

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

FAD: Dinucleótido de flavina e adenina

OIV: *International Organisation of Vine and Wine* (Organização Internacional da Vinha e do Vinho)

UV: Ultravioleta

YPD: *Yeast Extract Peptone Dextrose* (Extrato de levedura Peptona Dextrose)



# 1. Introdução

## 1.1. Motivação e objetivos

O vinho é um bem consumido mundialmente e em grande quantidade, sendo os maiores consumidores os Estados Unidos da América e a França com cerca de 3 mil milhões de litros anuais cada (Portugal consome cerca de 455 milhões de litros anualmente) (Wine Institute, 2013). Por isso, a sua produção está relacionada com a procura e com a matéria-prima disponível. Sendo o vinho feito de uvas que são colhidas numa época específica do ano torna-se difícil ter, de forma natural, um vinho pronto sempre que o mercado assim o exige. Por isso os grandes produtores usam métodos que permitem essa armazenagem do mosto, para que possam fermentar quando desejarem. O método mais usado é a adição de dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ). Nesse sentido é importante ter uma capacidade de armazenar o mosto sem que se recorra à adição de um químico, que para além de poder interferir com determinadas qualidades organoléticas, é um potencial causador de algumas doenças. Uma possível forma mais verde de se conseguir estabilizar o mosto em termos microbiológicos, enzimáticos e organoléticos poderá ser uma mais-valia na indústria vinícola e por isso revela-se neste campo um nicho que tem possibilidade de ser explorado.

A planificação desta dissertação compreendia o uso de mosto com dióxido de enxofre, sendo assim necessário, numa primeira fase, anular a sua ação através da adição de peróxido de hidrogénio. Numa fase posterior, previa-se a utilização do mosto sem o dióxido de enxofre, utilizando uma aplicação à escala laboratorial de métodos alternativos, neste caso a radiação ultravioleta. Consequentemente seria efetuada uma avaliação na redução da carga microbiana para determinar a eficácia do tratamento. Esta aplicação numa pequena escala tem a potencialidade de retribuir um *feedback* que poderá ser importante numa futura aplicação à escala industrial.

Tendo em conta a problemática exposta relativamente à adição de compostos químicos para a estabilização do mosto, os objetivos para esta dissertação passaram por estudar a aplicabilidade de peróxido de hidrogénio no processo de “desamuar” o mosto, sendo de seguida estudada a aplicabilidade de métodos alternativos ao  $\text{SO}_2$  na preservação do mosto de uvas brancas, neste caso a radiação ultravioleta e sua otimização, visando a aplicação prática. Para o efeito seriam realizadas análises físico-químicas e microbiológicas de forma a averiguar a eficácia dos métodos testados. Como tal seria preciso

fazer o estudo e montagem de um laboratório de microbiologia, que permita realizar testes microbiológicos simples.

### **1.2. A empresa: Vinhos Norte**

A Vinhos Norte é uma empresa de cariz familiar, que batalha pela qualidade dos seus produtos e a satisfação de todos os seus clientes. Situada em Várzea Cova, Fafe, foi fundada em 1971, por Manuel da Costa Carvalho Lima, tendo evoluído constantemente de forma a acompanhar os tempos atuais. Por isso e numa perspetiva de melhorar a focalização no cliente e organização interna, em 2000, a empresa iniciou um processo de certificação segundo a NP EN ISO 9001:2000. Foi pioneira neste campo, por ser a primeira empresa da área da produção de vinhos a implementar um sistema segundo este referencial. Em 2002 obteve a certificação do Sistema de Gestão e Qualidade, como é possível ver pelo logotipo da empresa onde está evidenciado a existência do SGQ (Figura 1). Em simultâneo a empresa concebeu e implementou um sistema HACCP, referente à segurança alimentar. Como reconhecimento do trabalho desenvolvido internamente, a Vinhos Norte obteve inúmeros prémios e medalhas, atestando a qualidade dos seus produtos. Entre as marcas mais conhecidas desta empresa pode enumerar-se o vinho espumante Miogo, o vinho Cruzeiro, e a seleção Tapada dos Monges. Recentemente a empresa lançou o Várzea do Minho, um vinho proveniente da casta Touriga Nacional, o qual recebeu medalha de ouro no *MUNDUS VINI* (Vinhos Norte, 2015).



Figura 1: Logótipo da empresa Vinhos Norte.

### **1.3. Organização da dissertação**

Este documento foi dividido em seis capítulos. No primeiro capítulo é feita uma introdução teórica ao trabalho, dando a conhecer o panorama geral sobre o mosto, o vinho e sobre a empresa Vinhos Norte. No segundo capítulo é introduzido o tema de estudo sobre o qual se debruça esta dissertação, são referidas noções importantes sobre os microrganismos presentes no mosto, os processos de

transformação de mosto em vinho, bem como conceitos sobre a radiação ultravioleta e peróxido de hidrogénio.

No capítulo 3 expõe-se a metodologia utilizada para conseguir realizar os objetivos propostos.

Relativamente ao capítulo 4, apresenta-se a planificação do laboratório que foi referido como um objetivo deste trabalho.

O capítulo 5 apresenta-se os resultados obtidos, fazendo a sua análise.

Por fim, no capítulo 6 indica-se algumas conclusões e sugestões para trabalhos futuros.



## **2. Fundamentação teórica**

### **2.1. O vinho**

O vinho é uma bebida descoberta à mais de 7500 anos e continua a ser apreciado em todo o mundo. A maioria dos investigadores acredita que o vinho é originário do sul do Cáucaso, onde hoje em dia se situa o Iraque, Azerbaijão, entre outros países. O vinho é um alimento bastante complexo, que requer um processo de fabrico longo e cuidado, pois tem inúmeros fatores que podem influenciar a sua qualidade.

Segundo o Regulamento CE n.º 491/2009, vinho num conceito geral é “o produto obtido exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mostos de uvas”. O mosto tem como definição “o produto líquido obtido naturalmente ou por processos físicos a partir de uvas frescas”. As uvas de que é proveniente o mosto e subsequentemente o vinho tem como definição “frutos de videira utilizados para vinificação, maduras ou mesmo ligeiramente passados, suscetíveis de serem esmagados ou espremidos com os meios normais de adega e de originarem espontaneamente uma fermentação alcoólica.” As uvas que podem ser usadas na produção de vinho têm de ser obrigatoriamente da espécie *Vitis vinifera* ou provenientes de um cruzamento entre esta espécie e outra do género *Vitis*, exceto as exceções definidas no regulamento n.º 491/2009.

Existem vários tipos de vinho, sendo a principal distinção entre branco, tinto e rosado. Em Portugal, existe uma grande variedade de vinhos, que podem ser distinguidos pela sua localização. Existem catorze regiões demarcadas que transmitem a riqueza dos vinhos no país, sendo uma delas a dos Vinhos Verdes. O Vinho Verde é um vinho leve e fresco, produzido no noroeste do país. Esta localização que em 1985 foi considerada Região Demarcada do Vinhos Verdes é uma região costeira, bem localizada em termos geográficos para a produção de vinhos brancos. Por várias questões existe uma subdivisão da região, pertencendo Fafe, onde se encontra localizada a empresa, à região do Ave. O Vinho Verde é caracterizado pelo baixo teor alcoólico, sendo por isso menos calórico, é um vinho frutado, com um limite máximo de para o título alcoométrico de 14 % vol. (CVRV, 2015; Portaria n.º 152/2015). As suas características são resultado do clima, do solo, das formas de cultivo e da particularidade das castas. Todas as garrafas produzidas têm para além do rótulo do engarrafador, um rótulo que identifica o vinho como sendo vinho verde, através de um logótipo específico (Figura 2).



Figura 2: Rótulo presente nos rótulos das garrafas de vinho verde (CVRVV, 2015).

A produção de vinho engloba várias atividades desde a receção das uvas até ao engarrafamento, podendo ser dividido em dois campos, a viticultura e vinificação. O processo de produção do vinho tem por base a viticultura, que corresponde a todo o processo de produção de uvas, sendo essencial uma boa viticultura para a produção de um bom vinho. Envolve a plantação, poda, possíveis tratamentos fitossanitários, a manutenção do solo e a vindima. O processo de produção do vinho começa meses antes do seu engarrafamento, como seria de esperar quando se envolve frutos. De janeiro a março faz a plantação das vinhas (alguns anos antes), esta época depende das características climáticas do local. Nos locais onde já existam vinhas procede-se à poda, que permitirá um desenvolvimento regular da planta e dos bagos. Durante o crescimento é necessário um acompanhamento das plantas, nomeadamente dos estados fenológicos da videira – abrolhamento, floração, vingamento e pintor – pois a existência de pragas e doenças pode afetar o crescimento e maturação dos bagos. Às uvas faz-se um acompanhamento da maturação, sendo esta detetada pela mudança de cor, em que simultaneamente ocorre uma redução da acidez. A data da vindima deve ser determinada por vários fatores, sendo o mais importante o grau de acidez, pois à medida que os ácidos são transformados em açúcar, a acidez diminui e o álcool provável aumenta.

A vinificação, de uma forma básica, é a transformação das uvas em vinho, envolvendo uma série de processos (Figura 3). A vinificação envolve diferentes processos para vinhos brancos e vinhos tintos. Neste projeto o foco será no vinho branco, devido à maior quantidade de produção e às suas características para o processamento alternativo escolhido (Infovini, 2015a). Neste caso, a fermentação alcoólica é feita com a separação do mosto do engaço (ramificações do cacho). As uvas quando chegam à adega devem ser desengaçadas, ou seja, retiram-se as partes lenhosas. Seguidamente as uvas podem ou não ser esmagadas antes de seguir para a prensa. Neste equipamento as uvas são transformadas em mosto, através da extração do sumo; no entanto, deve-se ter o cuidado de não dilacerar os engaços nem

## Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre

esmagar as grainhas (semente). Após este processo dá-se uma clarificação, onde todas as partes sólidas que não foram eliminadas no processo anterior ficam depositados para ser eliminados, pois podem conferir aromas indesejados ao vinho e dificultar futuros processamentos, dando assim origem às borras. Seguidamente realiza-se uma trasfega para a cuba onde ocorre a fermentação, normalmente com uma temperatura entre os 14 °C a 18 °C, chegando a durar 15 a 20 dias. Após a fermentação efetua-se uma nova trasfega, deixando novamente as borras acumuladas. Nesta fase pode ser adicionado dióxido de enxofre para conservar o vinho, embora alguns produtores façam esta adição logo após a obtenção do mosto para prevenir fermentações espontâneas. Numa fase já quase final é efetuada uma clarificação, onde o vinho pode ser filtrado, ou pode sofrer a adição de produtos clarificantes que aglomeram as partículas, que sedimentam posteriormente. A última etapa é o engarrafamento do vinho que pode ser feito em garrafão, garrafas ou *bag-in-box*, com a respetiva colocação da rolha, cápsula, rótulo (e por vezes contrarrótulo) e no caso dos vinhos verdes do rótulo de região demarcada (Infovini, 2015b).

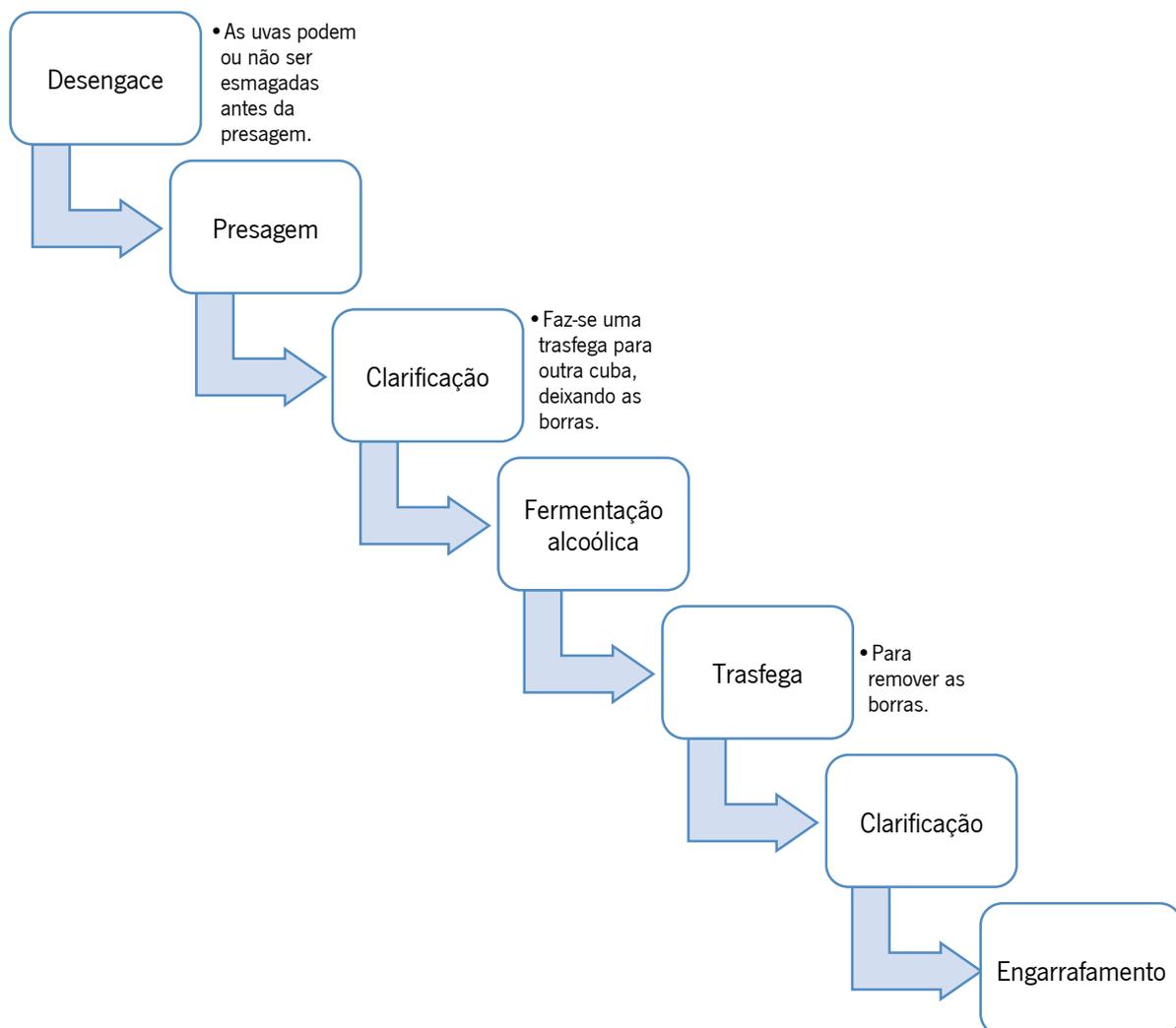
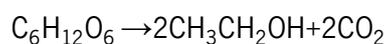


Figura 3: Esquema dos processos de vinificação.

### 2.1.1. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é a transformação anaeróbica de açúcares em etanol e dióxido de carbono, principalmente (Equação 1). As principais fontes de carbono e energia são a glucose e frutose, embora possam ser usados outros componentes em pequenas quantidades. Da mesma forma outros compostos podem ser produzidos, tais como álcoois superiores, acetaldeído, ésteres, glicerol, diacetilo, entre outros (Zamora, 2009). Durante a fermentação alcoólica as leveduras vão-se adaptando às várias mudanças das condições, produzindo assim diferentes produtos secundários, como por exemplo o glicerol e o ácido succínico, para manter o equilíbrio redox. Alguns destes compostos secundários conferem aromas característicos aos vinhos.



Equação 1

Glucose → Etanol + Dióxido de carbono

No início da fermentação alcoólica existe uma microflora variada, dependendo das condições do mosto. As fermentações que ocorrem na produção de vinhos podem ser divididas em 2 tipos: fermentações espontâneas ou fermentações inoculadas. As fermentações espontâneas são executadas pela microflora natural presente nas uvas.

Inicialmente as espécies presentes na superfície das uvas dominam aquelas encontradas na fermentação, existindo uma grande variedade de leveduras não-*Saccharomyces* na fase inicial da fermentação, contribuindo para a produção de etanol e de importantes compostos voláteis do aroma. No entanto, são consideradas como um problema, devido à produção em excesso de acetato de etilo e outros compostos com sabores desagradáveis (Boulton *et al.*, 1999). Enquanto a fermentação vai avançando a população de leveduras não-*Saccharomyces* diminui, enquanto as *Saccharomyces* aumentam (Fleet & Heard, 1993). No final da fermentação alcoólica, a *Saccharomyces cerevisiae* representa a maioria das leveduras encontradas. Por outro lado as espécies inoculadas dominam a fermentação mas não inibem de imediato as outras estirpes (Querol *et al.*, 1992). Desta forma, as estirpes indígenas podem ter um papel importante nas características sensoriais mesmo nas fermentações executadas por leveduras inoculadas. Ao inocular o mosto com leveduras pode-se escolher uma variedade de características de acordo com o vinho desejado, como por exemplo uma maior libertação de determinados compostos aromáticos. Estas características específicas das leveduras providenciam uma maior estabilidade aos produtores de vinho, pois permite ter uma fermentação sem paragens e com um produto final com as características desejadas.

Alguns fatores que podem influenciar a viabilidade quer de leveduras quer de bactérias são a variedade das uvas, a presença de tratamentos antifúngicos ou antibacterianos, condições climáticas e a existência de pragas na vinha (Pretorius *et al.*, 1999; Sapis-Domerq, 1980).

A uva madura contém uma porção notável de açúcar, constituída principalmente por glucose, frutose, pequenas quantidades de pentoses e também sacarose. O consumo da glucose começa imediatamente e é mais rápido do que o consumo da frutose, gerando assim um aumento na proporção desta, conforme se verifica na Figura 4 (Fleet, 1998). O constante aumento da razão frutose/glucose tem sido sugerido por alguns autores como a principal causa de paragens de fermentações (Berthels *et al.*, 2004).

A taxa do catabolismo de açúcar diminui continuamente com o decorrer da fermentação, devido à toxicidade do etanol e falta de nutrientes (Rodicio & Heimisch, 2009). Como o objetivo da fermentação é transformar os açúcares em etanol, a densidade vai diminuindo. O acompanhamento da densidade possibilita assim saber em que estado está a fermentação e fazer uma estimativa de quanto tempo vai demorar.

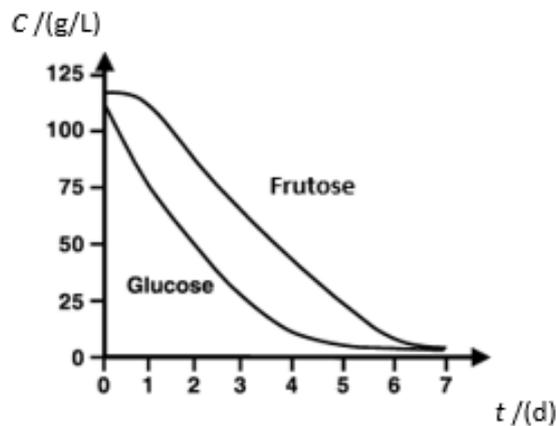


Figura 4: Perfil geral da concentração de glucose e frutose no mosto ( $C$ ) ao longo do tempo ( $t$ ), (Adaptado de Rodicio & Heimisch, 2009).

Numa fermentação natural, ou seja, com estirpes de leveduras naturalmente presentes no mosto, existe uma variedade de microrganismos, como é possível ver pela Figura 5. Pelo gráfico compreende-se que durante a fermentação primária ou alcoólica as *Saccharomyces* predominam, inativando toda a restante microflora devido à elevada concentração de etanol. No entanto, no caso de o vinho não ser estabilizado em termos microbiológicos e de ter alguns resíduos de açúcares, estes podem ser aproveitados pelas bactérias do ácido láctico (BAL) para conduzir uma fermentação secundária, a fermentação maloláctica, que pode ser desejada ou indesejada, dependendo do tipo de vinho.

À medida que o tempo passa, o vinho armazenado pode estar sujeito ao “ataque” por microrganismos que lhe conferem características indesejáveis, como mudanças na coloração ou no odor. Por este motivo o controlo microbiológico é importante durante todo o processo de vinificação.

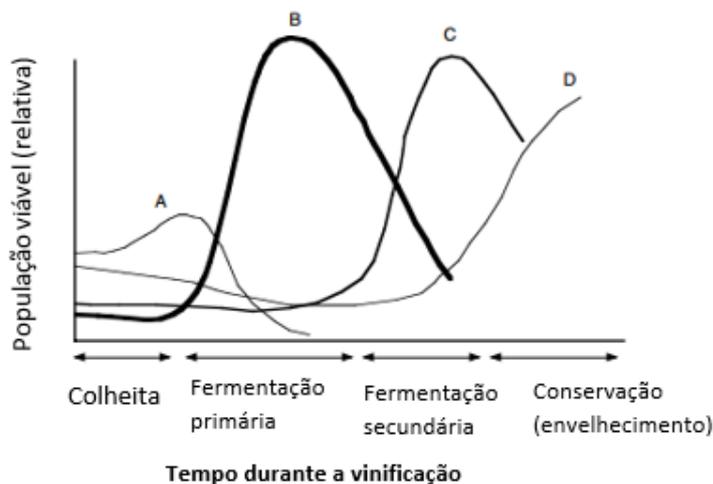


Figura 5: Perfil generalizado do crescimento durante uma fermentação com microflora natural. [A] leveduras não *Saccharomyces*; [B] *Saccharomyces*; [C] *Oenococcus oeni*; [D] leveduras/bactérias que podem deteriorar o vinho (Adaptado de Fugelsang & Edwards, 2007).

### 2.1.2. Fermentação maloláctica

A fermentação maloláctica normalmente ocorre após a fermentação alcoólica, com um atraso que depende das condições ambientais, da população de bactérias e de fatores químicos inerentes ao próprio vinho. Este atraso é na verdade uma fase de adaptação das bactérias ao ambiente que o vinho proporciona. Assim a fermentação maloláctica pode durar de 5 dias a 3 semanas (Lonvaud-Funel, 1995). Alguns dos fatores importantes para a fermentação são o pH, quantidade de etanol, concentração de sulfitos, a temperatura e a disponibilidade de açúcar, que nas condições ideais determinam uma melhor viabilidade e atividade específica de bactérias do ácido láctico, também denominadas bactérias lácticas (Krieger *et al.*, 1990; Versari *et al.*, 1999).

A fermentação maloláctica normalmente ocorre entre os 18 °C e 22 °C, sendo por isso condições favoráveis para o crescimento de *Oenococcus oeni*, a principal BAL no mosto, que tem uma temperatura ótima de crescimento entre os 20 °C e os 25 °C. Para temperaturas abaixo de 15 °C, a fermentação maloláctica é difícil ou mesmo impossível (Britz & Tracey, 1990). Estas temperaturas mais baixas têm efeitos prejudiciais na transcrição de mRNA, na tradução e replicação de ADN (Van de Guchte *et al.*, 2002), criando estruturas secundárias no mRNA que abrandam a transcrição (Sanders *et al.*, 1999). O decorrer da fermentação maloláctica traduz-se normalmente num aumento do pH do vinho devido à

conversão de ácido L-málico em L-láctico, com a produção de CO<sub>2</sub>. Como o ácido produzido é mais fraco, promove a estabilidade ao remover substratos fermentescíveis que possam existir no final da fermentação alcoólica (Jackson, 2008). A nível do consumidor pode-se destacar uma alteração do sabor do vinho, tendo em conta a produção de aromas particulares desta fermentação, dependendo da estirpe e espécie dos microrganismos, do pH e temperatura.

## **2.2. Microrganismos presentes no mosto/vinho**

No mosto existem vários microrganismos que podem estragar ou contribuir para a produção do vinho. São geralmente referidos em três grupos: leveduras, bactérias do ácido acético e bactérias do ácido láctico.

### **2.2.1. Leveduras**

As leveduras são o grupo de microrganismos mais importante na produção de vinho, sendo as espécies mais presentes no vinho a *S. cerevisiae* e a *S. bayanus*. Durante a sua produção podem ser encontradas várias espécies de leveduras, pois existem várias condições favoráveis, como o baixo pH, a alta quantidade de açúcar, o facto de rapidamente se formar um ambiente anaeróbico e a presença de compostos fenólicos. Este tipo de características do meio faz com que se forme um ambiente ótimo para o desenvolvimento de leveduras, e cria um ambiente “seletivo”, permitindo o crescimento destes em detrimento de outros (Bisson & Joseph, 2009). Para além desta preferência pela fermentação e de aguentar concentrações moderadas/altas de etanol, a *S. cerevisiae* tem algumas propriedades como ser osmotolerante, ser insensível à acidez e conseguir proliferar com concentrações baixas de oxigénio, que fazem com que seja ideal para o crescimento em mostos.

As leveduras usam principalmente a glicólise como forma de obter energia. A palavra glicólise deriva do grego *glucus*= doce e *lysis*=rutura. Este processo consiste na transformação intracelular de glucose e frutose em piruvato. As leveduras usam ainda a via das pentoses como mecanismo de obtenção de ribose e NADPH (Fosfato Dinucleótido de nicotinamida e adenina).

A glicólise é a principal via de catabolismo de açúcar, sendo composta por uma sequência de onze reações enzimáticas que degrada hexoses e liberta energia na forma de ATP (Adenosina Trifosfato) (Barnett, 2003; Gancedo, 1988). Como resultado desta via metabólica, cada molécula de hexose gera duas de piruvato, quatro de ATP e uma de NADH (Dinucleótido de nicotinamida e adenina). No entanto como são consumidas duas moléculas de ATP durante a fosforilação de hexoses, o ganho total de energia é de duas moléculas de ATP.

As leveduras são anaeróbicas facultativas e por isso possuem os mecanismos necessários para metabolizar açúcares quer aerobicamente, quer anaerobiamente (Boulton *et al.*, 1999). Ambas as vias iniciam-se com a glicólise, formando-se piruvato. Posteriormente o piruvato pode ser transformado em etanal, que após ser reduzido se transforma em etanol e dióxido de carbono, sendo este processo denominado de fermentação alcoólica. A fermentação alcoólica ocorre no citoplasma e regenera o NAD<sup>+</sup> que é consumido durante a glicólise. As leveduras podem também usar o processo de respiração para obter energia, tendo neste caso, um ganho de 26 a 38 moléculas de ATP. No entanto, esta via precisa da presença de oxigénio, pois este atua como substrato e é inibida com concentrações elevadas de açúcares (Crabtree, 1929).

As leveduras possuem algumas vias metabólicas que usam o oxigénio como substrato. Um exemplo é a biossíntese de esteróis e ácidos gordos (Ratledge & Evans, 1989). Durante o crescimento celular é necessário a criação de novas membranas plasmáticas e por isso é necessário a produção de esteróis, ácidos gordos e fosfolípidos durante as fases iniciais da fermentação alcoólica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Pasteur (1861) expôs o facto de que leveduras num meio arejado evidenciavam um aumento na biomassa, mas uma diminuição da taxa de consumo de açúcar e da produção de etanol, concluindo que a presença de oxigénio inibia a fermentação alcoólica. Isto acontece porque ao ocorrer a respiração, a célula consome quantidades grandes de ADP, o que influencia negativamente o transporte de açúcar para dentro da célula (Lagunas & Gancedo, 1983; Lagunas *et al.*, 1982).

No caso concreto da *S. cerevisiae*, esta apenas consegue usar a respiração se a concentração de açúcar for muito baixa e caso haja oxigénio no meio. Num meio natural como é o mosto, as leveduras apresentam um ciclo de vida que apresenta quatro fases: fase de latência, fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio (Figura 6). Neste ciclo de crescimento é possível verificar que nos primeiros tempos a população não aumenta. Esta é chamada de fase de latência (*lag*), onde se dá a adaptação das células ao meio. No caso concreto do vinho, a população celular inicial pode ser na ordem dos 10<sup>4</sup> mL<sup>-1</sup>, se não forem inoculadas leveduras, ou seja, se apenas se usar a microflora indígena. A contagem de células pode ser por método direto, ou seja, usando o microscópio e a câmara de Neubauer. Ou indireto, usando as placas de Petri para fazer inoculações. Quando se inocula com uma determinada estirpe de levedura, a concentração de células costuma ser maior do que a referida para o caso de não ser inoculadas leveduras, na ordem dos 5×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>. Estes fatores devem ser controlados, caso contrário pode dar origem a uma paragem na fermentação ou uma fermentação mais lenta que o normal.

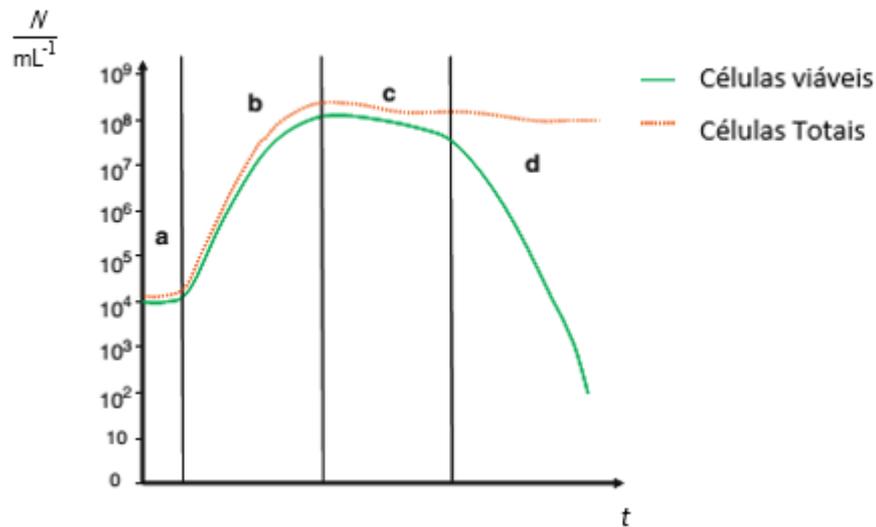


Figura 6: Ciclo de crescimento de leveduras representada a concentração celular ( $N$  – número de células) ao longo do tempo ( $t$ ). a: fase de latência; b: fase exponencial; c: fase estacionária; d: fase de declínio (Adaptado de Zamora, 2009).

Durante esta fase, a concentração celular aumenta até  $10^7 \text{ mL}^{-1}$  a  $10^8 \text{ mL}^{-1}$  e tem uma duração que varia de 3 a 6 dias. No final desta fase as leveduras param de crescer, devido à falta de nutrientes ou à produção de metabolitos tóxicos (o etanol pode interromper o transporte de glicose para a célula). Esta nova fase, fase estacionária, é representada por uma estabilização da população, durando de 2 a 10 dias. A última fase é a fase de declínio ou morte, em que as leveduras morrem devido à falta de nutrientes e acumulação de etanol e outras substâncias tóxicas, produzidas durante a fermentação (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1984). Como referido, para uma boa fermentação é necessário controlar as condições de forma a manter uma população viável, até que todos os açúcares sejam fermentados (Zamora, 2004). Embora o padrão de crescimento real seja muito semelhante ao apresentado, no mosto podem existir algumas variações, como a fase de latência demorar menos tempo ou ser inexistente. A fase exponencial e a fase estacionária podem demorar menos tempo. A fase de declínio pode começar antes dos nutrientes terem acabado, sendo por isso mais longa (Ribéreau-Gayon, 1985).

A rapidez ou ausência aparente de uma fase de latência no crescimento da levedura pode resultar de um estado de pré-adaptação das células que dão início à fermentação. A levedura seca ativa, que é usualmente usada no mosto, é proveniente de culturas que estavam na fase exponencial num meio arejado. Estas células têm mitocôndrias funcionais, capazes de fazer a respiração e também têm todas as enzimas fermentativas.

O ajustamento verificado na fase de latência nem sempre é visível, no entanto com condições menos ótimas esta pode ser mais pronunciada. Aquando da fase exponencial as leveduras crescem a uma taxa

máxima permitida pelas condições e a presença de oxigénio não afeta essa taxa (Schulze *et al.*, 1996).

Um dos motivos prováveis para o início da fase de declínio pode ser o aumento da disfunção da membrana celular, devido a efeitos combinados do etanol, ácidos gordos de cadeia média e escassez de precursores de esterol (Hallsworth, 1998; Viegas *et al.*, 1998).

O *stress* é qualquer fator ambiental que prejudique o crescimento das leveduras (Ivorra *et al.*, 1999). No caso das leveduras existem vários tipos de causas de *stress*: concentração de etanol, temperatura, nível oxidativo do meio, falta de nutrientes. A exposição em condições sub-letais de um determinado *stress* confere proteção não só para doses maiores desse mas também para outros diferentes. Este efeito é chamado de proteção cruzada (Jürgen & Rodicio, 2009). Alguns dos stresses que podem afetar as leveduras são:

#### A. Fontes de carbono e energia

As maiores fontes de carbono usadas são a glucose e a frutose, podendo ser usadas outras mas em pequenas quantidades. A concentração de glucose não só afeta a ativação dos mecanismos de transporte de açúcar como também regula a expressão de enzimas no TCA (ciclo dos ácidos tricarbóxicos). Pensa-se que a origem da tolerância das leveduras às elevadas concentrações de açúcar está relacionada com a reduzida permeabilidade da membrana ao glicerol ou com o aumento na produção do mesmo (Brewster *et al.*, 1993).

#### B. Etanol

A conversão de açúcares em etanol que ocorre durante a fermentação provoca *stress* para as leveduras, devido ao etanol. Este provoca efeitos adversos como mudanças na composição e permeabilidade da membrana (Gibson *et al.*, 2007). As leveduras ficam também suscetíveis a determinados ácidos orgânicos como o ácido acético, que juntamente com o aumento de permeabilidade da membrana causada pelo etanol leva à acidificação do meio intramembranar e desdobramento das proteínas e possível morte celular (Garay-Arroyo *et al.*, 2004).

No entanto, a *Saccharomyces cerevisiae* tem uma elevada tolerância ao etanol. Através da modificação da membrana plasmática é diminuída a permeabilidade, minimizando a perda de nutrientes e cofatores da célula. A função vacuolar da membrana também desempenha um papel importante na retenção de substâncias tóxicas (Kitamoto, 1989).

Embora a maioria das estirpes de *S. cerevisiae* possa fermentar até um título alcoólico volumétrico de 13 % a 15 %, existe uma grande variabilidade nesta capacidade. O metabolismo das leveduras começa a ter perturbações quando a concentração de etanol atinge os 2 % em volume (Dittrich, 1977), ocorrendo rutura no transporte do ião amónio e inibição de permeases, sendo que esta situação é agravada com o aumento da temperatura.

#### C. Compostos azotados

Os compostos azotados são dos nutrientes mais importantes para as leveduras, pois é necessário uma fonte de azoto assimilável para que estas sintetizem biomassa (Kunkee, 1991). No mosto existem vários compostos que contêm azoto, como ião amónio, aminoácidos, péptidos, proteínas, entre outros, mas apenas o ião amónio e os aminoácidos podem ser utilizados para tal efeito, ou seja, apenas estes podem ser assimilados (Hensche & Jiranek, 1993; Barre *et al.*, 1998). Concentrações elevadas podem promover multiplicação celular desnecessária e reduzir a taxa de conversão dos açúcares em álcool. Baixas concentrações podem causar paragens na fermentação. O azoto é usado para produzir proteínas e ácidos nucleicos.

#### D. Dióxido de enxofre

O dióxido de enxofre é produzido pela maioria das estirpes de *Saccharomyces*. Neste campo, pensa-se que não terá qualquer influência na competição das leveduras com outros microrganismos. No entanto, quando adicionado ao mosto ajuda na proliferação das estirpes mais resistentes a esta substância. Para além desta capacidade antimicrobiana o dióxido de enxofre interfere com o metabolismo das leveduras, ligando-se com vários compostos contendo o grupo carbonilo. Esta ligação faz com que seja precisa maior quantidade de SO<sub>2</sub> para ter o efeito antimicrobiano. O dióxido de enxofre aumenta a extração de compostos fenólicos das uvas.

#### E. Oxigénio

O processo de fermentação não precisa de oxigénio e mesmo na sua presença as leveduras fermentam. Contudo, o oxigénio é usado para produzir esteróis, que são incorporados na membrana celular. A hiperoxigenação favorece o crescimento celular e promove a fermentação. No sentido oposto a ausência de oxigénio pode parar a fermentação (Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2003).

#### F. Dióxido de carbono

O dióxido de carbono atua indiretamente no *stress* do meio ambiente, pois durante a fermentação são

libertadas para a atmosfera grandes quantidades de dióxido de carbono. Isto resulta numa geração de correntes dentro da cuba, ajudando na diminuição da temperatura e na distribuição dos nutrientes.

#### G. pH

O valor de pH no mosto normalmente não interfere com a fermentação, apenas quando o pH é demasiado baixo, ou seja, inferior a 3 é que a fermentação sofre perturbações.

#### H. Temperatura

A temperatura é um dos fatores mais importantes na fermentação. A maioria dos produtores de vinho branco usam temperaturas entre os 14 °C e os 18 °C, permitindo ao vinho ser mais frutado e fresco (Heard & Fleet, 1985). As variações podem afetar diretamente o metabolismo das leveduras, de modo a causar a morte com temperaturas elevadas. Temperaturas baixas diminuem a toxicidade do etanol, mas podem retardar a fermentação, ou mesmo pará-la. A subida da temperatura aumenta a fluidez da membrana e causa desdobraimento e agregação de proteínas citológicas, podendo dar-se uma paragem devido à desnaturação de enzimas e da membrana celular (Ough, 1966).

#### I. *Killer factors*

Existem ainda interações entre leveduras que se tornam num fator de *stress*, pois algumas podem produzir e segregar proteínas ou glicoproteínas, chamadas de *killer factors*, que inibem outras leveduras (Van Vuuren & Jacobs, 1992; Shimizu, 1993).

As leveduras são capazes de criar resistências ao *stress*. Um exemplo é a resistência ao dióxido de enxofre, que é resultado de uma contínua pressão seletiva pelo uso de compostos sulfurosos durante muitos anos. As estirpes de leveduras contêm um cromossoma específico para esta resistência. O dióxido de enxofre reage com compostos celulares, especialmente com grupos carbonilo, por isso a produção de acetaldeído pode funcionar como uma segunda resistência (Perez-Ortiz *et al.*, 2002). *S. cerevisiae* é também conhecida por exprimir proteínas de resistência a radiação UV, como parte dos seus mecanismos de reparação (Qiu *et al.*, 1998).

#### 2.2.2. Bactérias do Ácido Láctico

Estas bactérias são conhecidas por produzir principalmente ácido láctico a partir de glucose, sendo a sua classificação baseada na morfologia, modo de fermentar a glucose, a variedade de substratos e o crescimento a diferentes temperaturas. Cerca de 85 % das espécies são heterofermentativas, produzindo ácido láctico, CO<sub>2</sub> e etanol, ácido acético, através da via das pentoses fosfato. Normalmente

estas existem em habitats com abundância de nutrientes, decompondo plantas, frutas e produtos derivados de leite, fazendo parte da microflora natural do intestino humano. Devido à sua ação acidificante previnem danos na comida e crescimento de microrganismos (Hammes *et al.*, 1991). Algumas bactérias ácidas lácticas são usadas como probióticas, permitindo uma inoculação de bactérias benéficas para o intestino (Tannock, 2005). Podem também ser encontradas em uvas, no mosto e no vinho. Devido às condições ácidas típicas do vinho, as uvas são um habitat naturalmente favorável para estas bactérias e algumas espécies como *Oenococcus oeni* conseguem sobreviver a altas concentrações de etanol. Após o esmagamento das uvas aparecem os primeiros microrganismos, nomeadamente as leveduras e as bactérias lácticas. Normalmente em vinhos com pH baixo, ou seja, inferior a 3,5, *O. oeni* é a espécie dominante, enquanto em vinhos com pH ligeiramente superiores é *Pediococcus damnosus* que domina (Wibowo *et al.*, 1985 e 1988). A fermentação maloláctica conduzida pelas BAL pode ser desejada, no entanto, pode atribuir odores indesejáveis ao vinho.

As BAL são muito limitadas em termos nutritivos, sendo que todas as estirpes precisam de determinados compostos para sobreviver, como por exemplo: riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, entre outros.

Os carboidratos são usados quer pelas bactérias homofermentativas, quer pelas heterofermentativas como fonte de carbono e de energia. As bactérias lácticas produzem ácido láctico L(+) ou D(-) ou mesmo ou uma mistura racémica de isómeros (Kandler, 1983). No entanto, podem ocorrer mudanças no produto final devido a fatores ambientais, ou seja, dependendo das condições de crescimento, os produtos podem ser bastantes diferentes.

A energia é obtida principalmente através da fermentação de hexoses, como por exemplo glucose e frutose, sendo por este motivo competidores diretas com as leveduras. Estas bactérias metabolizam ainda pentoses (xilose, ribose) e os três principais ácidos presentes no mosto: tartárico; málico, que é convertido em ácido láctico L(+) e CO<sub>2</sub>; cítrico, que é convertido em ácido láctico, ácido acético, CO<sub>2</sub> e acetato de etilo.

Como já referido, as BAL estão associadas com a fermentação e preservação de vários alimentos, bem como com a digestão no intestino. Bactérias lácticas isoladas de vinho têm um crescimento ótimo entre os 20 °C e 37 °C. No entanto, durante a fermentação maloláctica o crescimento é ótimo a 20 °C (Ribéreau-Gayan *et al.* 2006a e 2006b). Devido à sua tolerância ao pH ácido e ao etanol é capaz de sobreviver no vinho. No entanto a sua atividade é inibida quando o título alcoométrico é superior a 8 %,

sendo a exceção a *Oenococcus oeni* que aguenta um teor de 14 %. Por esse motivo é uma das espécies mais presentes no vinho. É Gram-positiva, não móvel e é anaeróbica facultativa. Tem uma forma elipsoidal ou esférica e apresenta-se em pares ou em correntes (Dicks *et al.*, 1995; Holzapfel & Schillinger, 1992).

*O. oeni* é uma espécie heterofermentativa, podendo ser aplicada para provocar uma redução do ácido málico. Esta pode crescer durante a fase estacionária e a fase de morte das leveduras, pois estas libertam constituintes celulares que estimulam o crescimento bacteriano. No caso particular da *O. oeni*, esta produz glicosidases e proteases (enzimas que quebram ligação peptídicas) que têm uma grande influência na lise celular. A fermentação maloláctica permite a obtenção de um vinho mais estável (König & Fröhlich, 2009).

Aquando da fermentação alcoólica as leveduras multiplicam-se, consumindo açúcar e azoto mais rapidamente que as bactérias. No final da fermentação, ao ocorrer a lise celular das leveduras, são libertados para o meio metabólitos que ajudam o desenvolvimento de bactérias, como vitaminas e aminoácidos (Alexandre *et al.*, 2004; Guilloux-Benatier *et al.*, 2006). As bactérias lácticas no entanto crescem devagar, precisando de aminoácidos, vitaminas e níveis adequados de hidratos de carbono, preferindo ambientes acidificados. Deste modo, as BAL desenvolveram ao longo de anos, um arsenal de compostos antimicrobianos, como por exemplo, péptidos antimicrobianos e substâncias bactericidas (Schnürer & Magnusson, 2005), bem como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e diacetilo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). O peróxido de hidrogénio juntamente com o oxigénio oxida os grupos sulfurosos, desnaturando algumas enzimas. A peroxidação da membrana aumenta a sua permeabilidade, sendo que o peróxido de hidrogénio atua como um precursor para a produção de radicais livres com propriedades bactericidas (Byczkowski & Gessner, 1988). No entanto, também as leveduras conseguem produzir substâncias com características bacteriostáticas e bactericidas (Comitini *et al.*, 2005), libertando assim, durante a fermentação, metabólitos tóxicos para as bactérias (etanol, ácidos gordos, SO<sub>2</sub>), fazendo com que a população destas diminua (Alexandre *et al.*, 2004).

As bactérias do ácido láctico estão sujeitas a determinadas condições que as colocam numa situação de *stress*. Por exemplo o etanol que é produzido pelas leveduras é um dos fatores principais de inibição do crescimento de bactérias lácticas. A resistência ao etanol varia com as condições ambientais como a temperatura e o pH. Esta resistência diminui com a diminuição do pH e com temperaturas mais elevadas (Alegria *et al.*, 2004). A toxicidade do etanol advém da sua capacidade de se inserir na parte hidrofílica da membrana de dupla camada lipídica (Weber & de Bont, 1996).

As leveduras consomem os nutrientes disponíveis (glucose, frutose e fonte de azoto), podendo assim levar à falta de nutrientes. O próprio vinho revela-se complexo em termos de composição, tendo alguns componentes que inibem o crescimento bacteriano e outros que beneficiam (Campos *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2008). Esta complexidade pode assim limitar o crescimento das bactérias.

O pH é um fator preponderante no desenvolvimento de BAL no vinho, sendo que a maioria das bactérias lácticas são neutrófilas, ou seja, o pH ótimo de crescimento situa-se perto do neutro (Hutkins & Nannen, 1993). Nesse sentido, quanto mais baixo for o pH do vinho, maior será a fase de latência entre a fermentação alcoólica e a maloláctica, sendo que a valores de pH inferiores a 3,0 o crescimento bacteriano é quase nulo ou mesmo impossível (Lonvaud-Funel, 1995). O efeito mais evidente do pH é a diminuição do pH intracelular, sendo este um fator que permite controlar alguns processos celulares como a atividade enzimática, síntese de ATP e RNA e replicação de DNA, causa ainda desnaturação de proteínas (Molina-Gutierrez *et al.*, 2002) e altera a composição e fluidez da membrana celular.

A temperatura tem um papel decisivo na qualidade do vinho, afetando o crescimento dos microrganismos presentes, podendo atrasar ou parar a fermentação maloláctica. A maioria das bactérias lácticas são mesófilas, com a temperatura de crescimento ótimo entre os 25 °C e 30 °C em cultura laboratorial (Van de Guchte *et al.*, 2002). Quanto maior o conteúdo em etanol, mais baixa será a temperatura de crescimento ótimo.

Também a concentração de sulfitos ou de dióxido de enxofre afeta o crescimento de BAL, pois tendo estes uma ação antimicrobiana, são inibidores de microrganismos. Este químico consegue passar a membrana celular e reage no seu interior, interferindo na formação de coenzimas e vitaminas (Chang *et al.*, 1997). Com um pH baixo, o dióxido de enxofre possui uma capacidade antimicrobiana. No entanto, a *O. oeni*, por exemplo, tem a capacidade de criar resistência (Guzzo *et al.*, 1998).

Durante a produção do vinho existem processos que podem ser desfavoráveis para o crescimento de bactérias como é o caso da clarificação. Este processo elimina parte da microflora natural que posteriormente inicia a fermentação maloláctica e reduz a quantidade de nutrientes necessários para ambas as fermentações (Guzzo & Desroche, 2009).

### 2.2.3. Bactérias do Ácido Acético

As bactérias do ácido acético (BAA) estão incluídas na família *Acetobacteraceae*, que possui a particular característica de oxidar o etanol, transformando-o em ácido acético. Esta característica permite uma rápida oxidação de álcoois e açúcares, dando origem aos ácidos orgânicos correspondentes, tornando assim

este grupo de bactérias bastante suscetível de ser utilizadas em aplicações biotecnológicas, como a produção de ácido ascórbico (Deppenmeier *et al.*, 2002). As bactérias do ácido acético são usadas na produção de várias comidas e bebidas, principalmente quando são fermentadas, como por exemplo o vinagre. No entanto, a sua presença pode levar a desperdícios noutros alimentos, como é o caso do vinho e cerveja. São Gram-positivas, aeróbias estritas e têm a forma de bastonetes. No meio natural, as BAA ocorrem em compostos açucarados e em frutas que estejam parcialmente fermentadas, pois têm a capacidade de usar quer açúcares, quer etanol, transformando-o em ácido acético que limita o crescimento de outros microrganismos. Na presença de oxigénio a sua taxa de atividade e crescimento aumenta. O seu pH ótimo de crescimento é entre 5,5 e 6,3 e a temperatura entre os 25 °C e 30 °C, embora possam crescer a pH mais ácido, entre 3 e 4 (De Ley *et al.*, 1984; Du Toit & Pretorius, 2002).

Ao amadurecer as uvas, a concentração de açúcares aumenta, chegando a ter 20 % a 25 %, aumentando assim a probabilidade de crescimento de BAA. Em uvas saudáveis a espécie dominante é *Gluconobacter oxydans* (Prieto *et al.*, 2007; Renouf *et al.*, 2005). De forma espetável, uvas podres apresentam uma maior população de BAA, sendo as espécies mais presentes *Acetobacter acetie* e *Acetobacter pasteurianus* (Barbe *et al.*, 2001). Durante a fermentação alcoólica a temperatura pode levar ao aumento de bactérias, pois nos dias de hoje usa-se temperaturas controladas entre os 14 °C e 18 °C, de forma a aumentar a produção e a retenção de compostos voláteis. No entanto, o uso de temperaturas mais baixas pode levar a uma diminuição na taxa de crescimento de leveduras e por isso abrir a oportunidade para o crescimento de leveduras e bactérias nativas, podendo parar a fermentação pretendida (Llauradó *et al.*, 2002). Alguns fatores como a presença de SO<sub>2</sub>, o pH, a concentração de etanol, baixa temperatura e inoculação de leveduras são descritos como fatores inibidores do crescimento de BAA, podendo modificar a distribuição das espécies durante o processo. O crescimento de BAA durante a fermentação alcoólica está também relacionado com o número de bactérias e leveduras presentes no mosto no início da fermentação, pois como é possível verificar pela Figura 7, este valor pode determinar o número de células sobreviventes durante e após a fermentação (Du Toit & Pretorius, 2002; Watanabe & Lino, 1984).

A presença de BAA está usualmente relacionada com vinho estragado, pois ocorre um aumento de ácido acético e por isso aumentando a acidez volátil. As alterações que ocorrem dependem da fase do processo em que encontra o mosto/vinho:

- ◇ Uva e mosto: a presença resulta numa podridão ácida que pode envolver outros microrganismos como fungos, a fonte de carbono nesta fase é a glucose que é oxidada em ácido glucónico (Barbe *et al.*, 2001);

- ◇ Vinho: nesta fase ocorre a transformação de etanol em ácido acético, no entanto, a população de BAA diminui devido as condições anaeróbicas que as leveduras implementam e por isso produz quantidades limitadas. No entanto, em alguns casos, pode ser produzido em quantidades passíveis de ser detetadas no consumo (Guillamón & Mas, 2009).

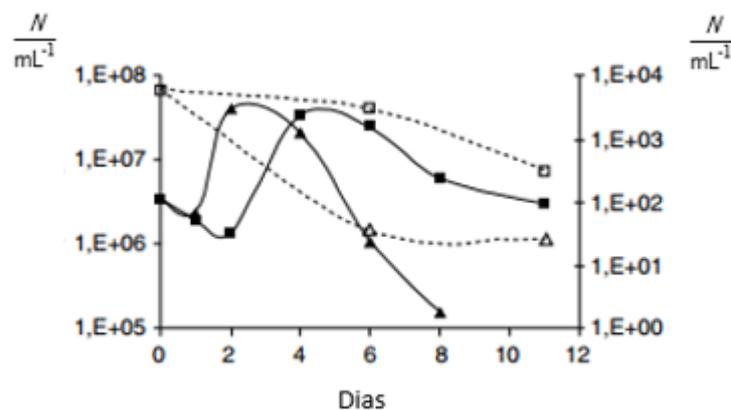


Figura 7: Comparação entre populações ( $N$  – número de células ao longo do tempo). Sendo a população de leveduras a linha a cheio e símbolos a cheio, eixo do lado direito e de BAA a linha a tracejado e símbolo aberto, eixo do lado esquerdo em fermentações inoculadas (triângulo) e espontânea (quadrado) (Adaptado de Guillamón & Mas, 2009).

### 2.2.4. Controlo microbiológico

No vinho, o controlo microbiológico não é aquele a que os produtores dão maior importância. O controlo das propriedades físico-químicas é mais reconhecido. No entanto existe uma crescente evolução no sentido de prestar uma maior atenção ao controlo microbiológico durante todas as fases de vinificação. O controlo efetuado aos microrganismos permite uma apreciação da sua estabilidade biológica e aspeto, pois eventuais contaminações podem originar características pouco desejáveis. O controlo não é apenas nos vinhos e mostos em si, mas também nos equipamentos que entram em contacto direto com o produto. Alguns pontos onde poderá ocorrer problemas são ao nível da rolhadora, da lavadora de garrafas e enchedora e por isso estes pontos devem ter uma especial atenção aquando a sua lavagem (Curvelo-Garcia, 1988).

O controlo de microrganismos no vinho pode ser composto por uma série de processos, que podem ser físicos como a filtração, ou químicos, como a adição de conservantes e esterilizantes. Os conservantes químicos podem inibir o crescimento e desenvolvimento de microrganismos sem os matar, podendo apenas colocá-los num estado de dormência. Já os esterilizantes, que pode ser bactericidas ou fungicidas, têm como função aniquilar os microrganismos presentes, quando corretamente aplicados.

Alguns dos microrganismos que podem estar presentes no vinho e causar efeitos negativos são:

- *Acetobacter*: as uvas com algum estrago a nível de fungos têm uma maior probabilidade de ter uma infecção de *Acetobacter* nos vinhos, no período de armazenamento. Esta possível contaminação pode ser impedida através de um programa de sanitização adequada;
- *Dekkera/Brettanomyces*: este género de leveduras tem uma particular resistência ao SO<sub>2</sub> (Du Toit *et al.*, 2005). Pode ser controlado o seu desenvolvimento através de filtração;
- *Saccharomyces*: são leveduras altamente resistentes ao SO<sub>2</sub>, talvez pela capacidade de produzir altas concentrações de acetaldeído, que se liga ao SO<sub>2</sub> (Ciani & Maccarelli, 1998). Assim a melhor forma de impedir esta contaminação é por filtração estéril. No entanto a sua existência é rara nos vinhos (Fleet, 2003);
- *Zygosaccharomyces*: esta levedura causa estragos no vinho, libertando CO<sub>2</sub>, formando depósitos e turvação nas garrafas. É resistente ao etanol, SO<sub>2</sub> e outros conservantes. As infeções estão normalmente associadas à adição de mostos com contaminações, para adoçar o vinho. No entanto, se forem cumpridas as boas práticas de fabrico, não deverá haver caso para alarme.

### **2.3. Meios de preservação do mosto**

Nos dias de hoje é necessário preservar o mosto de forma a conseguir armazená-lo, para posteriormente fermentar e produzir vinho durante todo o ano. Neste sentido os produtores utilizam a adição de dióxido de enxofre. No entanto, com a atual preocupação da saúde novas formas podem surgir.

#### 2.3.1. Meio atual de preservação: Dióxido de enxofre

O SO<sub>2</sub> é largamente utilizado pelas suas capacidades antioxidantes, antissépticas e antioxidásicas, pois permitem uma estabilização microbiológica e oxidativa do mosto durante o seu armazenamento.

O dióxido de enxofre quando misturado com água apresenta um equilíbrio entre três formas, como é possível ver pelas Equações 2, 3 e 4: forma molecular (SO<sub>2</sub> • H<sub>2</sub>O), ião bissulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e ião sulfito SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>.



Este equilíbrio é dependente do pH. No entanto, como o pH dos vinhos está normalmente entre os 3 e 4, a espécie predominante é o bissulfito. Pelo gráfico ilustrado na Figura 8 é possível verificar a variação da quantidade presente de cada uma das 3 espécies de dióxido de enxofre, de acordo com o valor de pH. Está descrito que a espécie que terá a capacidade de inibir os microrganismos é a molecular, pois, devido à inexistência de carga desta molécula, ela pode entrar na célula e sofrer uma dissociação provocada pelo pH citoplasmático dando origem ao ião bissulfito ou ião sulfato.

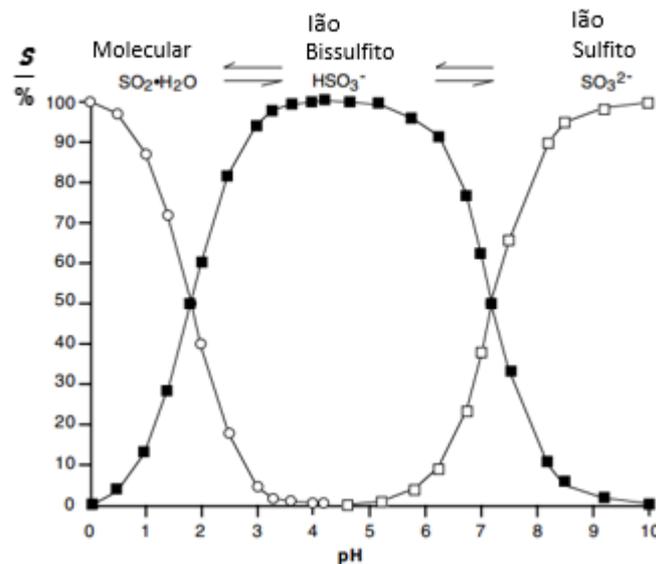


Figura 8: Gráfico que ilustra a quantidade (%) de cada forma do dióxido de enxofre presente de acordo com valores de pH (Adaptado de Fugelsang & Edwards, 2007).

À medida que a concentração de  $\text{SO}_2$  diminui devido aos mecanismos internos que procuram o equilíbrio, mais  $\text{SO}_2$  molecular entra na célula, aumentando assim a concentração no interior. A inibição pode ocorrer por vários mecanismos, como por exemplo a rutura de pontes de dissulfato em proteínas, tornando-as em componentes não assimiláveis, ou originando uma reação com cofatores como o  $\text{NAD}^+$  e o  $\text{FAD}$ . Pode ainda reagir com  $\text{ATP}$ , e promover a remoção do grupo amina da citosina, transformando-o em uracilo e consequentemente aumentando a probabilidade de ocorrência de mutações letais (Ough, 1993; Romano & Suzzi, 1993). A concentração de  $\text{SO}_2$  molecular necessária para impedir o crescimento celular varia de acordo com o mosto/vinho, o pH, a temperatura, o teor alcoólico, a população microbiana, bem como a sua diversidade, estado de crescimento, entre outros fatores.

O  $\text{SO}_2$  é usado na conservação de mostos, devido às suas capacidades redutoras, sendo capaz de reagir com variados compostos existentes nos mostos e vinhos. Estas reações de combinação são dependentes

do pH e da temperatura. O dióxido de enxofre inibe a atividade enzimática, prevenindo a oxidação e mudança de cor do vinho.

No mosto ou vinho, é possível medir a concentração de SO<sub>2</sub> como estando na forma “livre” quando não está ligado a nenhum composto, ou na forma “combinada” quando ocorrem as reações já referidas. A soma destas duas parcelas permite obter a concentração Total de dióxido de enxofre no mosto/vinho.

A fração livre tem uma capacidade antisséptica, capaz de inibir as bactérias do ácido láctico, bactérias do ácido acético e outras potenciadoras de doenças e defeitos nos vinhos. A resistência das leveduras a esta ação é variável, no entanto, é mais fraca nos vinhos do que nos mostos, devido à presença do etanol (Curvelo-Garcia, 1988). É considerado por alguns autores como um clarificador.

Na forma “combinada”, pode reagir irreversivelmente e dar origem à parte mais estável. Pode ainda reagir de forma reversível, dando origem a uma “reserva” de SO<sub>2</sub>, por se estabelecerem ligações mais instáveis que podem ser quebradas mais facilmente, libertando SO<sub>2</sub> quando a fração livre começa a diminuir. A fração combinada não apresenta qualquer atividade antimicrobiana. Entre os compostos que se ligam de forma irreversível pode-se destacar o etanal e outros compostos carbonilados como aldeídos e cetonas (Curvelo-Garcia, 1988).

Existem outros conservantes e esterilizantes como por exemplo o ácido sórbico, o ácido fumárico, o dimetil dicabornato, a lisozima, o monóxido de carbono, entre outros (Fugelsang & Edwards, 2007). Contudo, na indústria vinícola o mais utilizado é sem dúvida o dióxido de enxofre. No entanto, pode causar alergias, dando origem a vários problemas de saúde como dores de cabeça, irritação gástrica, náuseas, entre outros (Santos *et al.*, 2012). Devido aos problemas de saúde referidos a OIV (*International Organization of Vine and Wine*) tem vindo a reduzir a concentração máxima permitida nos vinhos. Atualmente nos vinhos brancos é permitido ter um concentração total de SO<sub>2</sub> de 200 mg/L e nos vinhos tintos 150 mg/L (Regulamento CE n.º 607/2009).

### 2.3.2. Meio alternativo de preservação: Radiação Ultravioleta

No mundo dos vinhos tem sido constante a adição de dióxido de enxofre aos mostos para os conservar em termos microbiológicos. No entanto, recentes estudos revelam um possível risco para a saúde e por isso cada vez mais se pensa em reduzir a sua adição (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a; Du Toit & Pretorius, 2000). Nos dias atuais existem alternativas para a inativação de microrganismos em alimentos líquidos como radiação UV, pasteurização, pulsos elétricos e pressão hidrostática (Sizer & Balasubramaniam,

1999). A radiação ultravioleta tem sido usada como método de desinfecção de água, de superfícies e de embalagens (Falguera *et al.*, 2011).

A radiação ultravioleta cobre uma pequena parte do espectro eletromagnético, mais precisamente entre os 100 e os 400 nm. Podendo ser classificada da seguinte forma: UV-A, dos 315 nm aos 400 nm; UV-B, dos 280 nm aos 315 nm e UV-C, dos 100 nm aos 280 nm (ISO 21348/2007).

Este tratamento é feito a baixas temperaturas e por isso é um tratamento de desinfecção não-térmico no qual não é reconhecida a produção de metabolitos tóxicos ou mesmo não-tóxicos durante o processo, nem gostos ou aromas desagradáveis quando, por exemplo, se trata água ou mesmo sumos. O processo em si necessita de pouca energia comparativamente à pasteurização (Tran & Fariq, 2004). Contudo, a luz UV pode ter um efeito na cor de moléculas orgânicas de produtos frutícolas, pois é absorvida por cadeias duplas, fazendo com que estas reajam com o oxigénio transformando-se em ligações simples (Nassau, 1998).

A luz UV é uma forma fácil de matar a maioria dos microrganismos, tendo um efeito nocivo em bactérias, vírus, bolores e leveduras (Bintsis *et al.*, 2000). O efeito da luz UV depende do tipo de líquido, da sua densidade, da sua cor, da capacidade de absorção da radiação UV por parte do líquido, do tipo de microrganismos e da sua fase de crescimento, do caudal, da existência de sólidos suspensos, da espessura da película do líquido (design do reator) e da intensidade da lâmpada (bem como da potência e comprimento de onda característica da lâmpada) (Shama, 1999; Bintsis *et al.*, 2000).

A radiação UV afeta os microrganismos ao nível do DNA, afetando a replicação e a transcrição de ácidos nucleicos, funcionando como uma pasteurização fria, permitindo que se processe alimentos mais sensíveis a variações térmicas. O pico da máxima absorção do DNA situa-se entre os 250 nm e os 280 nm. O DNA, ao absorver a luz UV, fica sujeito a um cruzamento de ligações entre pirimidinas vizinhas na mesma cadeia de DNA (Miller *et al.*, 1999). A morte ou inativação acontece devido a esta mudança na formação da ligação química do DNA (Stoother, 1999).

A frequência correspondente ao comprimento de onda de 254 nm é usada como desinfetante de superfícies, águas e outros alimentos líquidos como sumos de fruta (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004 e 2005). Na indústria alimentar tem sido usado para inativar microrganismos e enzimas em diferentes produtos líquidos. Em termos enzimáticos a inativação ocorre devido a agregações proteicas, enquanto a nível microbiológico a inativação ocorre devido a danos no DNA, impedindo a reprodução (Tiwari *et al.*, 2009).

Fredericks *et al.* (2011) realizou um estudo com vinho branco (Chardonnay) e vinho tinto (Pinotage), nos quais inoculou bactérias lácticas e bactérias do ácido acético e tratou-os com radiação UV. Os resultados indicam que existe uma inativação de vários microrganismos, entre eles *Saccharomyces*, *Acetobacter* e *Oenococcus*. No caso concreto da *Saccharomyces* houve uma redução de 2 ciclos logarítmicos para uma dosagem de 1337 J/L.

Segundo Falguera *et al.* (2013), a radiação UV é eficaz ao inativar parcialmente a polifenol-oxidase e reduzir a acidez volátil (uma medida indireta da qualidade do vinho). No entanto, os autores referem que para a inativação ser total deverão ser realizados estudos de otimização do processo, para assim evitar possíveis estragos no mosto devido a esta enzima.

Contudo, bolores e leveduras são mais resistentes do que bactérias provavelmente devido à estrutura do DNA ser composta por menos bases pirimidinas. Para além disso a composição química e espessura da parede celular são diferentes. Embora na teoria todos os microrganismos sejam sensíveis à radiação UV a sensibilidade vai depender da resistência à penetração e da existência de vários mecanismos de reparação (que dependem de fatores ambientais). Por exemplo meios mais ricos que contenham peptona têm um efeito protetor, pois ajudam no aumento de ribossomas que atua como um escudo para o DNA (Snowball & Hornsey, 1998).

Um dos problemas deste método é a pouca profundidade de penetração da luz UV nos líquidos, exceto a água (Shama, 1999). A penetração em sumos é de cerca de 1 mm para uma absorção de 90 % da luz, sendo por esse motivo sugerido que se use um regime turbulento no processamento (Sizer & Balasubramaniam, 1999). Outros problemas que se evidenciam com a utilização deste método são o elevado tempo de retenção necessário e o baixo volume que é possível tratar, por isso, uma possibilidade para obter uma maior eficácia é o aumento do tempo de residência seja pela diminuição do caudal ou pelo aumento do número de passagens no aparelho. Estas duas opções, no fundo, aumentam o tempo de exposição à luz UV.

### **2.4. Supressão do dióxido de enxofre**

#### **2.4.1. Peróxido de Hidrogénio**

O peróxido de hidrogénio é um forte oxidante, com um aspeto transparente, é semelhante à água, mas tem um odor muito característico, não sendo inflamável. É um composto estável à temperatura ambiente se armazenado corretamente (Mattos *et al.*, 2003). O peróxido de hidrogénio é usado em várias

aplicações, quer domésticas, como na desinfecção de feridas cutâneas, quer em termos industriais, como no tratamento de água e efluentes. Tem como vantagens ser miscível com água e ter uma boa atividade bactericida e algicida, um custo relativamente baixo quando comparado com outros biocidas e não gerar subprodutos tóxicos na água. Alguns autores referem que o poder biocida do peróxido de hidrogénio pode ser melhorado quando combinado com outros compostos, como por exemplo com o ozono, ferro, ou radiação ultravioleta.

O dióxido de enxofre não reage diretamente com o oxigénio, mas sim com a sua forma reduzida, o peróxido de hidrogénio (Elias *et al.*, 2010). Desta forma o dióxido de enxofre pode ser um inibidor da formação de aldeídos que resultam da oxidação do etanol (Figura 9).

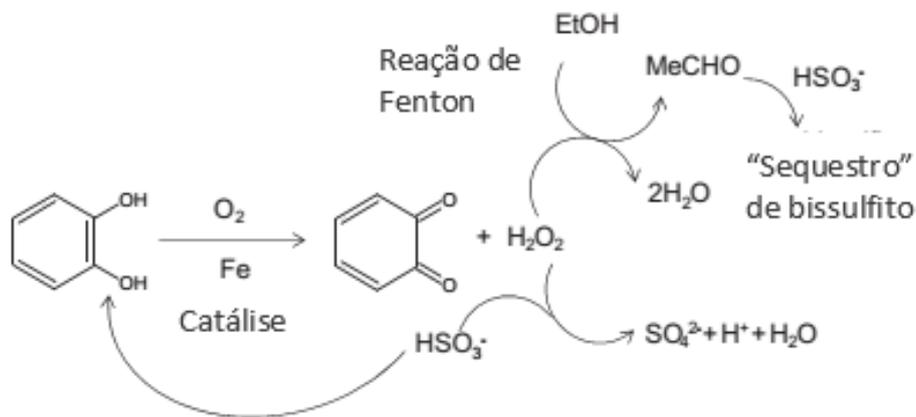
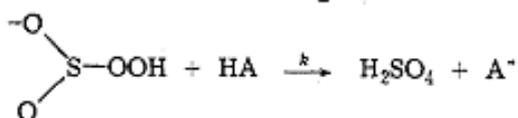
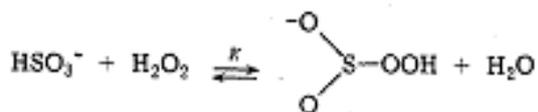


Figura 9: A interação de SO<sub>2</sub> com peróxido de hidrogénio e quinonas após oxidação de catecol, evitando assim a oxidação do etanol pela reação Fenton (Adaptado de Elias *et al.*, 2010).

Visto que o pH nos mostos e vinhos está normalmente entre os 3 e 4, a espécie mais presente é o ião bissulfito, por isso as interações entre o bissulfito e o peróxido de hidrogénio podem ser esquematizadas como nas Equações 5 e 6.



Onde HA=H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> ou H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, e A é dependente de HA (H<sub>2</sub>O ou HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>).

A adição de peróxido de hidrogénio ao mosto, na presença de dióxido de enxofre, vai levar à reação descrita nas Equações 5 e 6, que ocorre provavelmente por um deslocamento nucleofílico provocado pelo peróxido de hidrogénio no ião bissulfito, formando assim ácido sulfúrico, entre outros produtos (Hoffman & Edwards, 1975). Será preciso um cuidado especial, pois este químico pode trazer graves problemas para a saúde, caso haja a intenção de comercializar ou beber vinho produzido por este mosto.

O  $H_2O_2$  pode ser formado durante a oxidação de fenóis no vinho, sendo que alguns autores como Boulton *et al.* (2001) indicam que a adição de  $SO_2$  tem como principal ação antioxidante a reação com  $H_2O_2$ , limitando assim a oxidação de etanol ou outros compostos. Esta situação deve ser controlada pois o peróxido de hidrogénio pode, em associação com o ião ferro  $Fe^{2+}$  gerar compostos oxigenados altamente reativos como o radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), sendo este processo denominado de reação Fenton (Choe & Min, 2005). O peróxido de hidrogénio ao reagir com o ião ferro forma o radical hidroxilo, que por ser muito instável reage quase imediatamente, sem qualquer seletividade, com compostos presentes no meio, com uma taxa quase proporcional a sua concentração. Um dos exemplos é a oxidação do etanol para formar aldeídos (etanal). Segundo Waterhouse & Laurie (2006) os compostos fenólicos são os reagentes primários quando está presente oxigénio. Afirmam ainda que como os vinhos tintos têm uma maior quantidade destes compostos do que os vinhos brancos, tendo por isso uma maior tolerância ao oxigénio. Esta oxidação provoca uma mudança de cor no vinho.

O peróxido de hidrogénio tem um efeito tóxico para as bactérias e leveduras, devido à produção de radicais hidroxilo no meio intracelular, que atacam alguns dos componentes vitais para a sobrevivência da célula, como os lípidos, as proteínas e o DNA, levando assim à morte celular (Penna *et al.*, 2001). É possível realizar um processo de eliminação de bactérias ou leveduras usando a combinação peróxido de hidrogénio/radiação ultravioleta, existindo três possibilidades para a inativação celular (Labas *et al.*, 2007):

- ◇ Fotólise do DNA das células;
- ◇ Ataque do  $H_2O_2$  às membranas celulares, enzimas intracelulares e ao DNA;
- ◇ Ataque pelos radicais livres, gerados aquando da reação de fotólise do  $H_2O_2$  às membranas, enzimas e DNA.

A molécula de peróxido de hidrogénio é capaz de atravessar a membrana celular. No entanto, não o faz livremente, sendo que a sua travessia pode ser regulada através de alterações da composição da membrana celular (Branco *et al.*, 2004).

## **Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre**

As leveduras possuem mecanismos de defesa quer enzimáticos quer não enzimáticos, que as permite proteger, mantendo o equilíbrio redox. Em termos enzimáticos podem-se destacar a catalase, o citocromo C peroxidase, a redutase, entre outras enzimas que decompõem os oxidantes. Os mecanismos não enzimáticos baseiam-se em moléculas solúveis em meio aquoso ou lipídico, atuando como radicais, ou seja, reagindo com os oxidantes e removendo-os (Jamieson, 1998).



### 3. Metodologias

As etapas realizadas para a elaboração desta dissertação podem ser sumariadas no esquema da Figura 10.

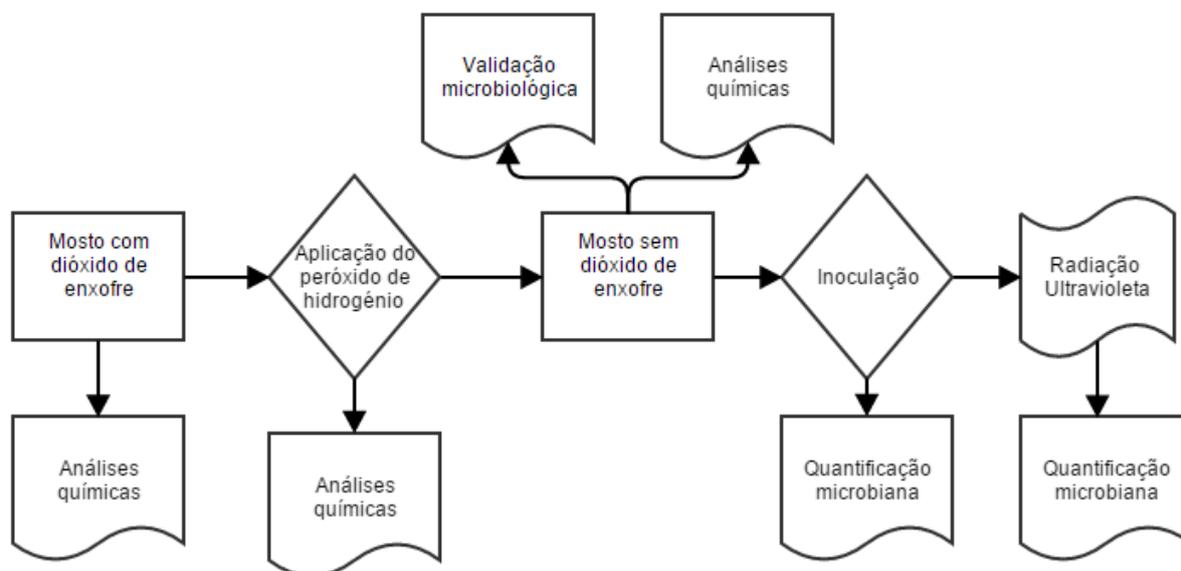


Figura 10: Esquema das etapas realizadas para a elaboração da dissertação.

Foi utilizado mosto amuado com dióxido de enxofre (cerca de 1 g/L). Nesse sentido foi realizada a adição de peróxido de hidrogénio no sentido de anular a ação do SO<sub>2</sub>. A aplicação do peróxido de hidrogénio está explicada no subcapítulo 3.1. Como foi referido no subcapítulo 2.5.1 existe a produção de ácido sulfúrico devido à combinação entre o peróxido de hidrogénio e o dióxido de enxofre. Para comprovar esta teoria, foi feito um estudo aos sulfatos pelo método OIV-MA-AS321-05A.

De forma a ter uma perceção da acidez foram realizadas medições do pH e da acidez total. A acidez total foi determinada por titulação com indicador de Azul Bromotimol (Anexo 1). Foram feitas medições da concentração de SO<sub>2</sub> Total e Livre e após o valor da concentração de SO<sub>2</sub> total atingir o pretendido (o mais próximo de 0 quanto possível) foi feita uma validação microbiológica. Embora o objetivo da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tenha sido o de anular a ação do SO<sub>2</sub>, está referido na literatura que o peróxido de hidrogénio tem um efeito nocivo nos microrganismos. Tendo em conta esse facto procedeu-se à validação, que teve como finalidade verificar a existência de microrganismos viáveis no referido mosto. Assim caso o resultado fosse positivo para a presença, não seria necessário inocular artificialmente o mosto, caso contrário seria necessário recorrer a leveduras secas ativas. O mosto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi inoculado em placas

de Petri na Universidade do Minho (Anexo 2). Nesse mosto, após a validação microbiológica, foi feita uma inoculação de leveduras usadas habitualmente para a fermentação dos mostos da empresa. Foi realizada uma quantificação microbiológica através da câmara de Neubauer (Anexo 3). O mosto em questão foi exposto à radiação ultravioleta, após a qual se realizou uma nova contagem celular, com o objetivo de determinar a eficácia do tratamento. Para estudar a eficácia da radiação ultravioleta, foi decidido estudar a variação do tempo de retenção através da variação do caudal e o seu efeito na diminuição da carga microbiana.

### **3.1. Estudo da aplicação do peróxido de hidrogénio**

Neste projeto pretendeu-se averiguar a aplicabilidade do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). A remoção do  $SO_2$  é conseguida pela adição de peróxido de hidrogénio. Para aferir a quantidade a adicionar ao mosto, seguiu-se o seguinte método:

- i. Mediu-se a concentração de  $SO_2$  total (valor a ser removido) com o aparelho Sulmatic. Este aparelho permite medir a concentração de  $SO_2$  Livre e Total, sendo a fração combinada a subtração da parte Livre da Total (Anexo 4);
- ii. Calculou-se a quantidade de  $SO_2$  total a remover (Anexo 5).

De forma a acompanhar a evolução da concentração de  $SO_2$ , foram feitas medições da concentração total e livre de  $SO_2$ , 30 min após a adição de peróxido de hidrogénio e no dia seguinte, antes de uma nova adição.

### **3.2. Inoculação do mosto**

De forma a ter uma carga microbiana presente no mosto, para posteriormente submeter à radiação ultravioleta, este foi inoculado com leveduras. Para tal foi necessário fazer a reidratação da levedura habitualmente usada (KB.-12) em água tédida. No mosto foi adicionado fosfato de amónio, que é um nutriente para leveduras e também Biovitamine®, que contem de forma a fornecer mais nutrientes às leveduras. A adição destes componentes está relacionado com a quantidade de mosto a fermentar, tendo cada fornecedor a indicação dessas mesmas quantidades.

As inoculações foram acompanhadas com a amostragem diária na qual se mediu a densidade e temperatura (Anexo 6). Utilizou-se o procedimento OIV-MA-AS2-01B:R2009. Inicialmente deve-se colocar o mosto numa proveta de 500 mL, seguidamente deve ler-se a densidade. Após retirar o densímetro colocar o termómetro e registar a temperatura. Caso a temperatura não seja 20 °C proceder às

respetivas correções presentes na tabela para correções de densidade no mosto (ver Delanoë *et al.*, 1984).

### **3.3. Contagem Celular**

Para fazer a amostragem antes e depois do tratamento com radiação UV, foi efetuada uma ligeira agitação do bidão, recolha de 5 mL a meia altura do bidão. Retiraram-se 2 mL para fazer a diluição, sendo que nos casos em que não se realizou diluição retirou-se na mesma 2 mL para manter constante o método de amostragem. Retiraram-se 0,2 mL dessa suspensão para juntar a 0,2 mL de solução azul-de-metileno a 200 mg/L.

### **3.4. Processamento através de radiação ultravioleta**

O aparelho usado (Figura. 11, A) tem uma forma cilíndrica, com uma cabeça na qual se conecta uma lâmpada de raios ultravioleta que fica no interior do recipiente azul, permitindo assim desinfetar ou esterilizar líquidos como a água. Retirou-se as seguintes informações do aparelho de tratamento de ultravioleta. Patent no 4971687; 220 V, 1 Amp; PURA UV20-1.

Verificou-se de facto que este aparelho é usado para desinfetar água, comercializado pela Pura™, tendo as seguintes características (Anderson, 1990; Pure Water Products, 2015): Peso: 7,3 kg; Dimensões: 63,5 cm×14,0 cm×14,0 cm; Caudal: até 30 L/min; Lâmpada: 1 lâmpada de 22 W, com comprimento de onda de 254 nm.



Figura 11: A- Aparelho de ultravioleta (Retirado de Pure Water Products). B- Recipiente de receção do mosto antes de ir para o aparelho de UV.

O recipiente mostrado na Figura 11, B foi o local de receção do mosto antes de entrar no aparelho de ultravioleta, tendo um volume de 16 L. Como é possível ver pela mesma figura, existe uma torneira e um regulador a ele acoplados. O recipiente, através de um compressor foi preenchido com ar comprimido, obrigando assim o mosto a ser expelido do recipiente e seguir a tubagem até ao aparelho de ultravioleta. No final da passagem pelo aparelho, o mosto era armazenado no bidão de 20 L.

Numa primeira fase procedeu-se à marcação do regulador para conseguir ter uma forma de controlar melhor o caudal (Figura 12). Como o mostrador não indicava qualquer pressão (não estava funcional), não foi possível determinar a pressão que realmente estava a ser usada no recipiente.



Figura 12: Regulador e torneira.

Por esse motivo foi feito um estudo do caudal, ou seja, manobrando o regulador e a torneira para diferentes posições, varia-se o caudal, sem assim alterar a pressão no compressor. Com esta marcação foi possível medir o caudal movimentando o regulador de forma a ter 1,5 voltas; 1,75 voltas e 2 voltas. A posição da torneira também foi variada neste estudo, sendo que foram usadas 4 posições (Figura 13).

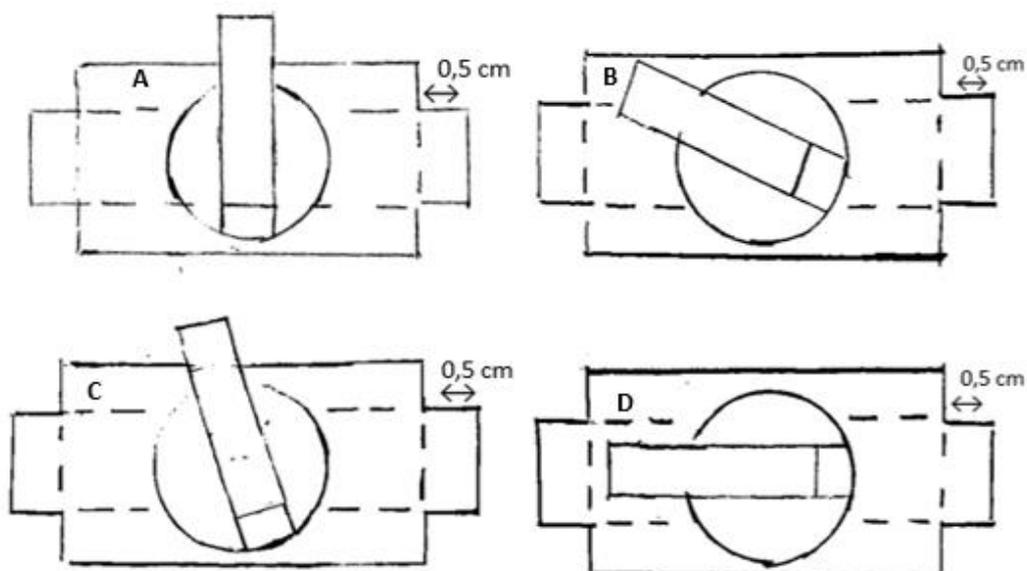


Figura 13: Desenho técnico da vista superior da torneira. A- posição 0; B- posição 1; C- posição 2; D- posição 3.

Obteve-se o caudal, enchendo uma proveta de 50 mL e cronometrando o tempo que demorou a encher, sendo feitas duas réplicas para cada caudal. Sabendo que o recipiente tem um volume de 16 L, calculou-se o tempo de retenção.

A totalidade do sistema pode ser visualizado na Figura 14, onde se consegue ver a entrada do ar comprimido, a passagem do mosto para o aparelho de radiação ultravioleta e o seu armazenamento no bidão.



Figura 14: Esquema utilizado para as experiências com a radiação ultravioleta.

### **3.5. Estrutura das experiências**

A organização utilizada para a realização das experiências pode ser descrita pelo esquema da Figura 15.

A experiência 1 foi feita com o regulador a 1,5 volts e a torneira na posição 3, ou seja, totalmente aberto.

A experiência 2 manteve o caudal apenas se alterando as condições do mosto, no qual se procedeu a uma diluição 1/10, para testar o efeito da diminuição da absorvância na eficácia do processo. Sendo a absorvância a capacidade dos materiais absorverem uma determinada radiação numa frequência específica, ao fazer a sua medição, verifica-se que quando aumenta a absorvância aumenta a concentração celular. Sabendo esta informação é possível afirmar que ao fazer a diluição a concentração celular é inferior e por isso terá uma turvação também inferior. A medição da absorvância foi feita com recurso ao espectrofotómetro, a 254 nm e 520 nm.

Quanto à experiência 3 o regulador foi colocado na posição para 2 voltas, mantendo-se a posição 3 na torneira. Relativamente à experiência 4 foi feita uma dupla passagem pelo aparelho de UV com o caudal da experiência 3. Na experiência 5 foi feita uma tripla passagem pelo aparelho de UV com o caudal da experiência 3. Por fim, na experiência 6 foi efetuada uma dupla passagem pelo aparelho UV com o caudal da experiência 1. Cada experiência teve apenas uma réplica.

<b>Experiência 1</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Regulador a 1,5 voltas e torneira na posição 3</li></ul>
<b>Experiência 2</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Regulador a 1,5 voltas e torneira na posição 3*</li><li>• *diluição 1/10 do mosto</li></ul>
<b>Experiência 3</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Regulador a 2 voltas e torneira na posição 3</li></ul>
<b>Experiência 4</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dupla passagem regulador a 2 voltas e torneira na posição 3</li></ul>
<b>Experiência 5</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tripla passagem regulador a 2 voltas e torneira na posição 3</li></ul>
<b>Experiência 6</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dupla passagem regulador a 1,5 voltas e torneira na posição 3</li></ul>

Figura 15: Esquemática da estrutura das experiências realizadas.

## **4. Resultados e discussão**

### **4.1. Laboratório de microbiologia**

Para a montagem de um laboratório de microbiologia deve-se começar por fazer uma listagem de materiais que são necessário. Deste forma, é possível comparar com os materiais existentes e ver quais são os materiais ou reagentes que são necessários comprar.

#### 4.1.1 Listagem dos materiais necessários

De forma a conseguir realizar o ensaio microbiológico e fazendo parte dos objetivos iniciais, foi feito um estudo de forma a aferir os principais materiais e equipamentos necessários, bem como um estudo de mercado para a montagem de um laboratório de microbiologia. Obteve-se preços dos referidos materiais e equipamentos.

Sabendo que a contagem de células pode ser feita por inoculação em placas de Petri ou por visualização ao microscópio, os equipamentos/materiais/reagentes considerados como sendo relevantes para a implementação de um laboratório de microbiologia, tendo em conta algumas indicações segundo OIV (2013), são:

- Autoclave;
- Estufa;
- Espectrofotómetro;
- Microscópio;
- Balança;
- Frigorífico;
- Micropipeta (e respetivas pontas);
- Placas de Petri.
- Tubos de cultura;
- Frascos de tampa azul;
- Câmara de Neubauer;
- Conta-gotas;
- Pipetas;
- Bicos de Bunsen ou lamparinas;
- Espalhador;
- Corante azul-de-metileno;
- Água peptonada;
- Meio para leveduras: YPD;
- Meio para bactérias: *Tomato Juice Agar*;
- Água desionizada;

#### 4.1.2. Listagem dos materiais existentes

Para evitar gastos desnecessário foi feito um inventário de materiais e equipamentos passíveis ser usados neste tipo de experiencias:

- ✓ Microscópio;

## Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre

- ✓ Balança;
- ✓ Lâminas: 4 *packs* de 50 lâminas;
- ✓ Lamelas: 4 *packs* de 100 lamelas (22 mm\*22 mm); 2 *packs* de 100 lamelas (20 mm\*20 mm);
- ✓ Tubos de ensaio com tampas metálicas: 8;
- ✓ Tubos de ensaio (de diâmetro superior e sem tampa): 40;
- ✓ Estufa (temperatura máxima 200 °C);
- ✓ Forno (temperatura máxima 60 °C);
- ✓ Frascos de tampa azul (500 mL);
- ✓ Conta-gotas;
- ✓ Pipetas (desde 1 mL até 50 mL);
- ✓ Frigorífico;
- ✓ Espectrofotômetro (UV-Vis);
- ✓ Água desionizada.

### 4.1.3. Listagem dos materiais a requerer

Retirando os equipamentos e materiais já existentes, a lista de equipamentos/materiais/reagentes a adquirir fica:

- Autoclave;
- Micropipeta (e respectivas pontas);
- Câmara de Neubauer;
- Bicos de Bunsen ou lamparinas;
- Frascos de tampa azul (500 mL, que possam ser autoclavados);
- Espalhador;
- Corante azul-de-metileno;
- Água peptonada;
- Meio para leveduras: YPD;
- Meio para bactérias: *Tomato Juice Agar*;
- Placas de Petri.

### 4.1.4. Orçamento

Foram pedidos/consultados orçamentos a diferentes empresas fornecedoras de materiais e reagentes laboratoriais (Anexo 7), dos quais a estimativa mais barata é apresentada na Tabela 1.

## **Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre**

Tabela 1: Somatório dos materiais necessários, indicando o fornecedor, preço (*P*) e quantidade

Produto	Fornecedor	<i>P</i> /€	Quantidade
Meio YPD	A	44,00	500 g
Meio Tomato Juice Agar	E	234,00	500 g
Água peptonada	D	46,00	500 g
Placas de Petri	A	43,20	480 (estéreis)
Frascos de Vidro	D	2,80	1
Lamparina	B	18,50	1
Micropipeta	C	95,00	1
Pontas micropipeta	C	5,00	96 (rack)
Azul-de-metileno	B	9,85	25 g
Câmara de Neubauer	C	47,00	1
Autoclave	B	1 872,00	1 (12 L)
Espalhador	Fabrico próprio	0,00	1
Total		2 417,35	

\*Os preços indicados não são na sua totalidade com o valor acrescido do IVA.

Não incluindo também os custos dos portes de envio.

A existência de 2 meios nesta lista deve-se ao facto de que o *Tomato Juice Agar* ser um meio específico para bactérias, mais concretamente para bactérias ácidas lácticas e o meio YPD ser um meio específico para leveduras. A soma de todos os materiais, não incluindo IVA em alguns casos e não contando com os custos de transporte ronda os 2417 €.

### 4.1.5. Materiais adquiridos

Destes materiais e reagentes foi possível adquirir a câmara de Neubauer, o corante azul-de-metileno e os componentes para fazer o meio YPD e a água peptonada.

No entanto, por falta de tempo e devido à empresa estar a atravessar uma mudança na sua estrutura interna, com novos mercados e uma constante procura para satisfazer todos os seus clientes, não foi possível realizar a parte da compra, instalação e uso dos materiais em causa. Usufruiu-se apenas da câmara de Neubauer, possibilitando assim um estudo da inativação de leveduras pela radiação ultravioleta através de contagem microscópica.

#### 4.2. Estudo da aplicabilidade do $H_2O_2$ na anulação do $SO_2$

A matéria-prima deveria ser mosto “fresco” mas como o estágio ocorreu muito após as vindimas, não foi possível usar mosto considerado fresco. Como foi dito anteriormente no capítulo 3, procedeu-se inicialmente à dessulfitação do mosto. Para o efeito usou-se peróxido de hidrogénio e mediu-se a concentração de dióxido de enxofre livre, combinado e total, sendo os resultados desses ensaios apresentados pelas Figuras 16, 17 e 18.

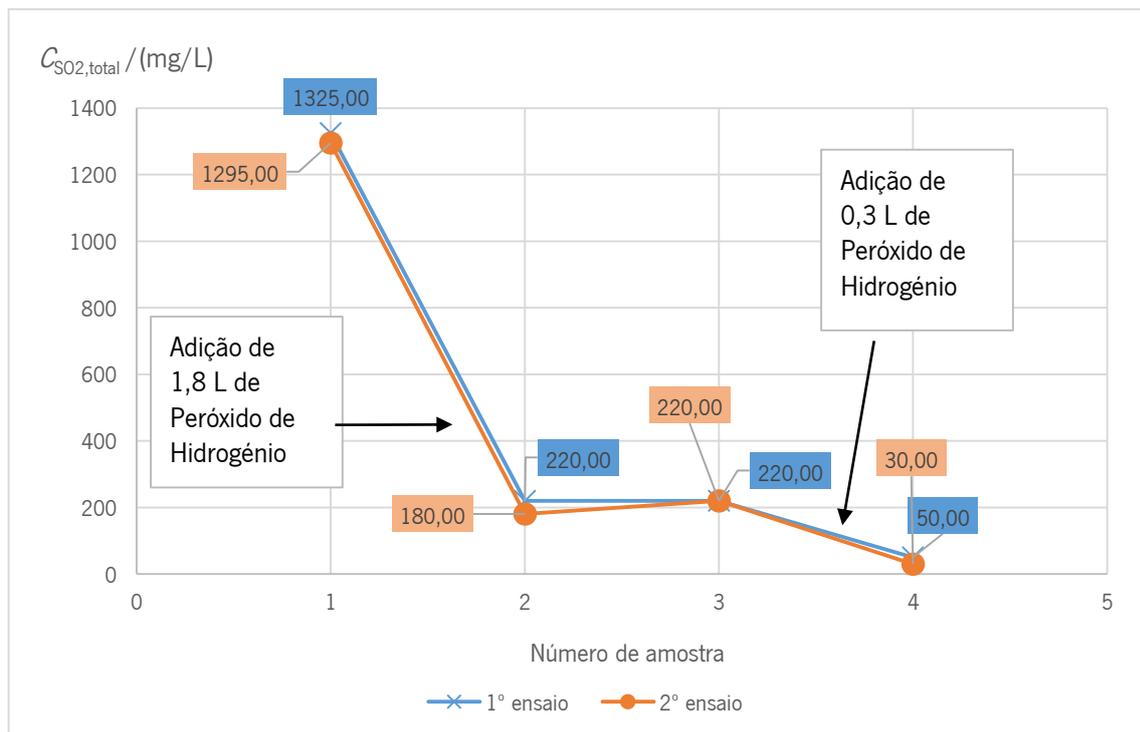


Figura 16: Variação da concentração de  $SO_2$  Total ( $C_{SO_2total}$ ) no processo de remoção pelo  $H_2O_2$ .

Foram feitos 2 ensaios para reduzir a presença de valores provenientes de erros de utilização do aparelho. Sendo o volume de mosto 1000 L.

Como é possível verificar pelas Figuras 13, 14 e 15 houve uma diminuição muito acentuada da concentração de dióxido de enxofre logo após a primeira adição. Esta situação deve-se ao facto de ser uma quantidade consideravelmente maior que a segunda e por haver uma procura constante pelo equilíbrio estequiométrico na solução, provocando assim uma reação entre o peróxido de hidrogénio e o dióxido de enxofre.

As amostras 2 e 4 foram feitas 30 min após a adição de  $H_2O_2$ , permitindo assim perceber como decorre a reação na proximidade à adição de  $H_2O_2$ .

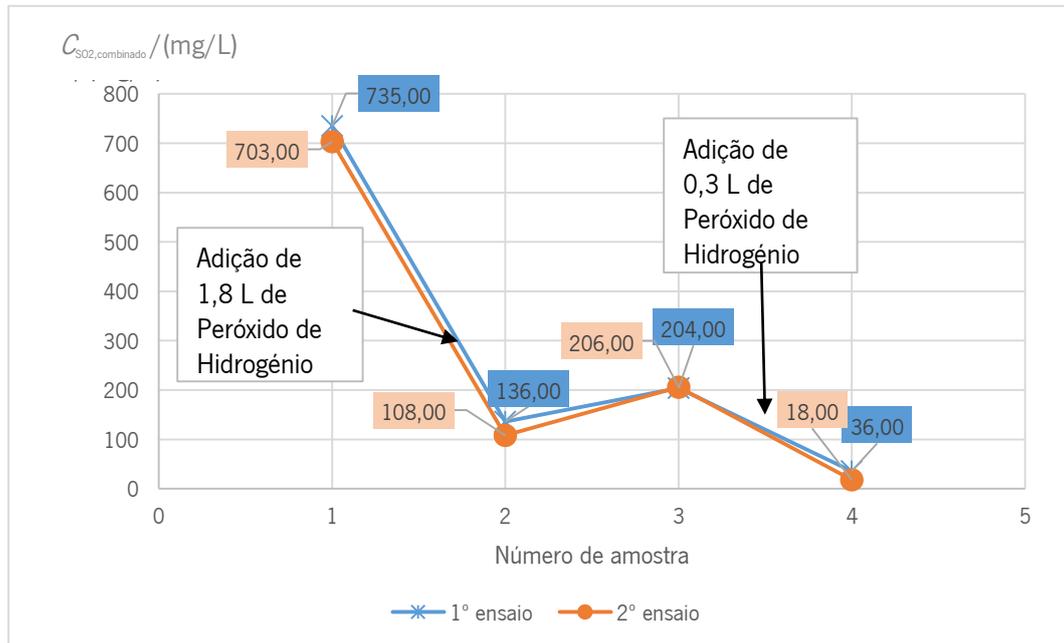


Figura 17: Variação da concentração de  $SO_2$  Combinado ( $C_{SO_2,combinado}$ ).

Olhando para a Figura 16, observando o valor da amostra 3 que foi feita no dia seguinte à primeira adição é pertinente concluir que houve um aumento que se torna desprezável devido a possíveis erros de leitura do aparelho e do utilizador, pois se considerarmos o 1º ensaio, a concentração mantém-se constante.

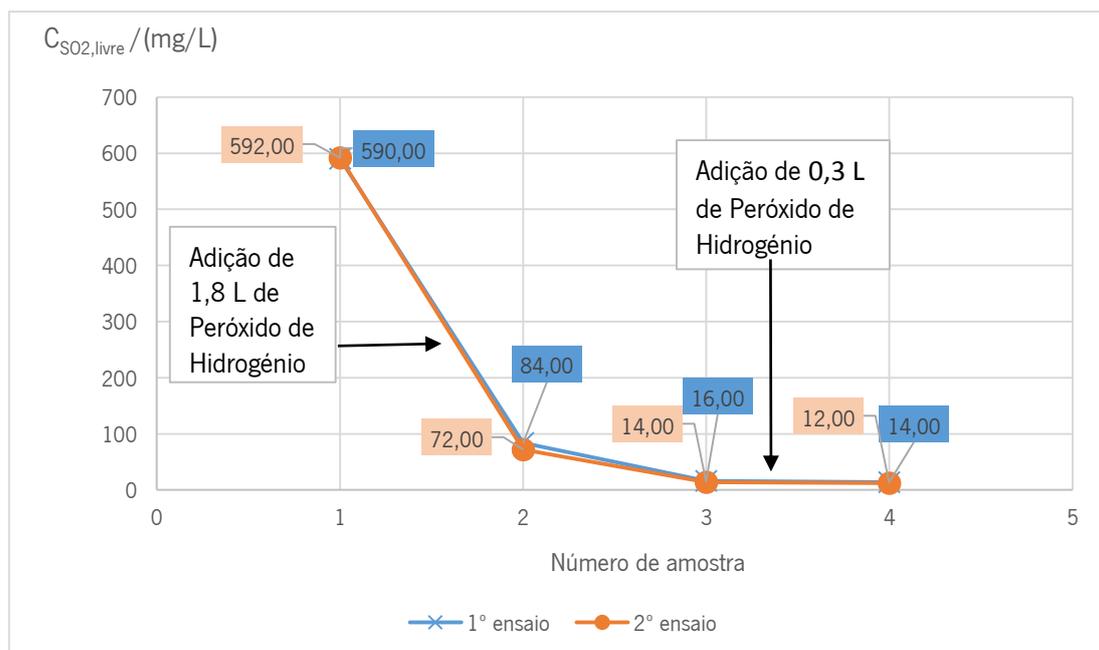


Figura 18: Variação da concentração de  $SO_2$  Livre ( $C_{SO_2,livre}$ ).

## Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre

Olhando agora para as Figuras 17 e 18, que dizem respeito à variação da concentração de  $\text{SO}_2$  Combinado e Livre, respetivamente, pode-se visualizar que a amostra 3 não vai de encontro ao que está previsto na literatura, pois ocorre um aumento da concentração de  $\text{SO}_2$  Combinado. O previsto seria haver uma diminuição, pois ocorre libertação, dando origem a  $\text{SO}_2$  na forma Livre, na tentativa de atingir novo equilíbrio. Neste caso ocorre a combinação de  $\text{SO}_2$  livre, para tentar atingir o equilíbrio.

Como foi referido anteriormente a adição de peróxido de hidrogénio ao dióxido de enxofre forma em termos estequiométricos, ácido sulfúrico. Por este motivo fez-se um acompanhamento da acidez com a medição do pH e da acidez ( $AT_{\text{acidtart}}$ ), expressa como ácido tartárico, apresentada na Figura 19.

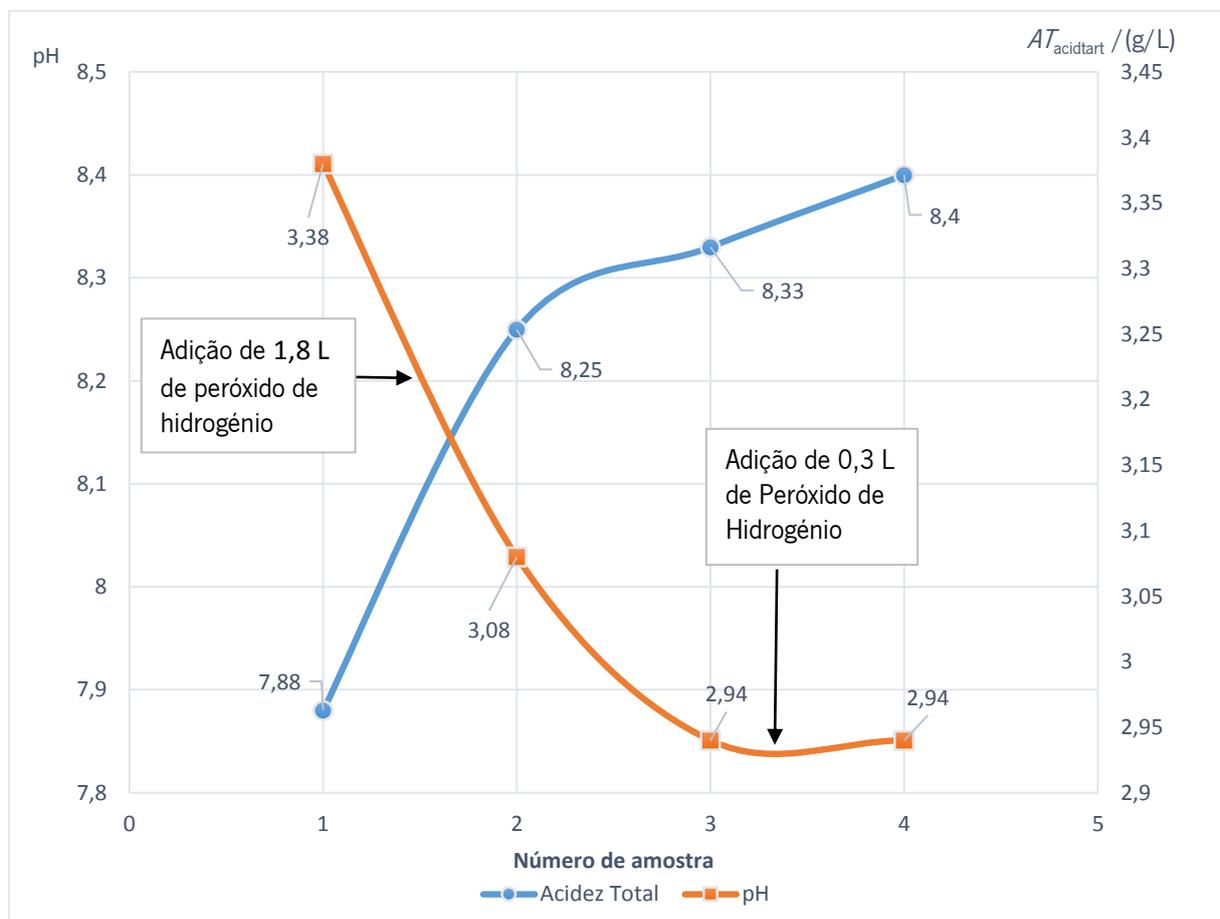


Figura 19: Evolução da acidez Total ( $AT_{\text{acidtart}}$ ) e do pH para os ensaios de remoção do  $\text{SO}_2$  com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Como se pode ser pelo gráfico da Figura 16 existe um aumento da acidez (corroborada pela diminuição do pH), levando a crer que existe de facto a produção de ácido sulfúrico devido à combinação entre o peróxido de hidrogénio e o dióxido de enxofre. Foi pedido simultaneamente a um laboratório particular que fizesse essa mesma análise dos sulfatos pelo método AOAC 955.26, sendo o resultado expresso no Anexo 8.

Estes resultados do laboratório independente indicam uma concentração de sulfatos iguais a 0,6 g, expressos como  $K_2SO_4$ , sendo o limite legal indicado pela portaria n.º 334/94 de 31 de maio, inferior a 2 g/L. Com esta informação pode-se especular, dizendo que ocorre de facto formação de ácido sulfúrico, mas não ocorre numa quantidade suficiente para que ponha em risco a saúde do consumidor.

#### **4.3. Validação microbiológica**

Após os testes iniciais com o peróxido de hidrogénio, averiguou-se a presença de microrganismos no mosto. Como se pode ver pela Figura 20, apenas uma placa de Petri, sem diluição apresentou uma colónia. Neste sentido foi considerado que após a adição de  $H_2O_2$  o mosto fica livre de microrganismos, por um lado devido à formação de ácido sulfúrico, por outro lado devido aos poderes bactericidas do  $H_2O_2$ , ou mesmo devido ao efeito do  $SO_2$ . Por esse motivo decidiu-se proceder à inoculação de mosto com leveduras comerciais, para conseguir estudar o efeito da radiação ultravioleta nesses microrganismos.



Figura 20: Placa de Petri, inoculada com mosto, sem diluição.

#### **4.4. Estudo dos caudais**

Ao iniciar o estudo dos caudais permitidos pelo aparelho verificou-se que a pressão do compressor que fazia o líquido movimentar-se era de 200 kPa (2 bar). Ao longo da tubagem podem existir perdas, e visto que o mostrador no recipiente não indicava qualquer pressão foi feito um estudo do caudal. Verificou-se então que o líquido só fluía com o regulador no mínimo com 1,5 voltas e que após 2 voltas não se notava incremento no caudal. De forma a determinar os caudais, fez-se variar a posição do regulador, sendo os resultados exprimidos na Tabela 2.

Tabela 2: Tabela dos resultados do caudal ( $Q$ ) e tempo de retenção hidráulica ( $\tau$ ) para 1,5 voltas, 1,75 voltas e 2 voltas e para as respetivas 3 posições relevantes

	<b>Posição</b>	$\frac{Q}{10^{-2}L/s}$	$\frac{\tau}{s}$
<b>1,5 voltas</b>	Posição 1	0,5	3200,0
	Posição 2	1,0	1600,0
	Posição 3	1,0	1600,0
<b>1,75 voltas</b>	Posição 1	1,3	1230,8
	Posição 2	1,2	1333,3
	Posição 3	1,3	1230,8
<b>2 voltas</b>	Posição 1	3,1	516,1
	Posição 2	3,4	470,6
	Posição 3	3,0	533,3

Como é possível verificar pela Tabela 2, na maioria dos casos as variações entre as diferentes posições da torneira eram pequenas, exceto para o caso de 1,5 voltas. Por esse motivo para os ensaios microbiológicos optou-se por usar sempre a torneira na posição 3, para no caso de 1,5 voltas não ter um tempo de retenção demasiado longo, evitando ficar quase um dia de trabalho para conseguir fazer a experiência, facilitando assim a coordenação das atividades.

Decidiu-se mudar apenas o regulador de 1,5 voltas para 2 voltas, pois o tempo de retenção de 1,5 voltas era próximo de 1,75, não havendo por isso uma boa distribuição quanto aos tempos de retenção, o que permitiu estudar os "extremos".

#### **4.5. Quantificação microbiológica**

Esta parte do trabalho teve como objetivo principal o estudo da radiação ultravioleta na carga microbiana presente no mosto. Como após adicionar peróxido de hidrogénio ao mosto foi aferido que não existiam microrganismos viáveis, efetuou-se inoculações, das quais se retirou amostras e se fez passar pela radiação ultravioleta.

Para estudar a eficácia variou-se o caudal e consequentemente o tempo de retenção. Assim para a experiência 1, o caudal calculado foi de 10 mL/s e o tempo de retenção foi de 1600 s. Este caudal e

tempo de retenção foram iguais para experiência 2. Quanto à experiência 3, o caudal foi de 30 mL/s e o tempo de retenção foi 533,3 s. Como na experiência 4 foi feita uma dupla passagem pelo aparelho de UV com o caudal da experiência 3, o tempo de retenção é dobro (1066,6 s). Da mesma forma para a experiência 5 em que foi feita uma tripla passagem pelo aparelho de UV com o caudal da experiência 3, o tempo de retenção é o triplo (1599,9 s). Por fim, na experiência 6 foi efetuada uma dupla passagem pelo aparelho UV com o caudal da experiência 1, sendo o tempo de retenção o dobro dessa experiência (3200 s).

A experiência 2 teve como objetivo verificar se uma menor turvação se traduz numa maior eficácia. Foi feita a medição da absorvância a 254 nm e 520 nm, sendo os valores visíveis na Tabela 3.

Tabela 3: Tabela que demonstra os valores de absorvância média de dois ensaios a 254 nm e 520 nm ( $Abs_{Med}$ ) de acordo com o comprimento de onda ( $\lambda$ ) usado na lâmpada UV da experiência 2

Diluição	$\lambda$ /nm	$Abs_1$	$Abs_2$	$Abs_{Med}$
1/1	254	1,147	—	1,147
	520	2,553	—	2,553
1/10	254	1,025	0,92	0,973
	520	0,843	0,624	0,733
1/20	254	0,535	0,585	0,560
	520	0,245	0,304	0,275

Como é possível ver pela Tabela 3 existe uma diminuição na absorvância com o aumento do fator de diluição, o que seria espectável pois ao diluir a concentração celular é inferior.

O gráfico da Figura 21 permite visualizar o decréscimo da carga microbiana com a aplicação da radiação ultravioleta. Este gráfico foi construído através do cálculo da concentração celular, usando a contagem feita na câmara de Neubauer (Anexo 9).

A experiência 1 serviu como ponto de referência, por isso usou-se o caudal com o valor mais pequeno, ou seja, com o tempo de retenção maior. Assim foi possível comparar as outras experiências e saber qual a melhor em termos de eliminação da carga microbiana.

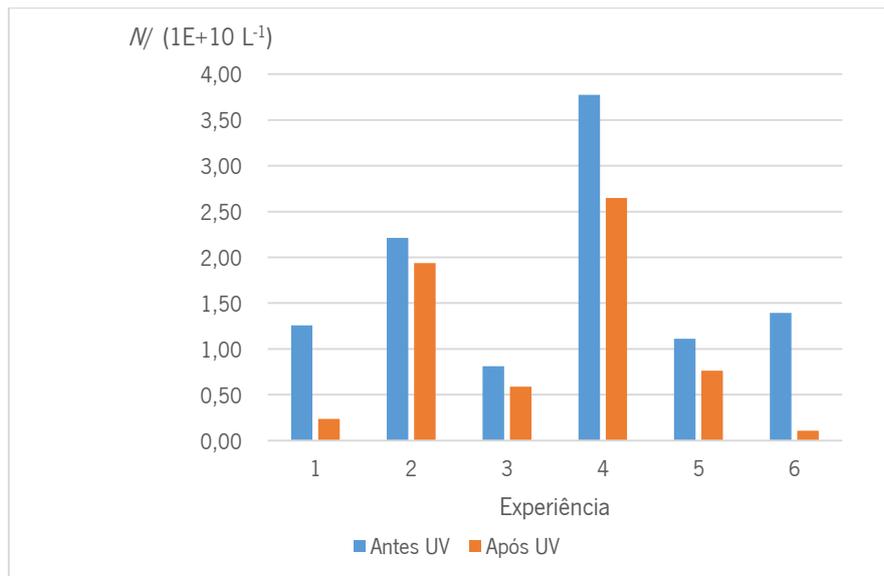


Figura 21: Evolução da concentração celular (*N*) no estudo do efeito dos raios UV.

Através da concentração celular inicial e final, foi possível calcular a diferença, entre a população de leveduras antes e após o tratamento com radiação ultravioleta, sendo assim possível comparar em termos de eficácia.

#### Experiência 1

$$\bullet 1,26\text{E}+10 - 2,38\text{E}+09 = \mathbf{1,02\text{E}+10}$$

#### Experiência 2

$$\bullet 2,21\text{E}+10 - 1,948\text{E}+09 = \mathbf{2,75\text{E}+10}$$

#### Experiência 3

$$\bullet 8,13\text{E}+09 - 5,88\text{E}+09 = \mathbf{2,25\text{E}+09}$$

#### Experiência 4

$$\bullet 3,78\text{E}+10 - 2,65\text{E}+10 = \mathbf{1,13\text{E}+10}$$

#### Experiência 5

$$\bullet 1,11\text{E}+10 - 7,63\text{E}+09 = \mathbf{3,50\text{E}+09}$$

#### Experiência 6

$$\bullet 1,39\text{E}+10 - 1,06\text{E}+09 = \mathbf{1,29\text{E}+10}$$

Tendo em conta que a diferença, ou seja, a eficácia da experiência 2 é superior à da experiência 3, mas inferior às das experiências 1, 4, 5 e 6 isso quer dizer que o facto de se ter diluído o mosto de forma que ficasse menos turvo não teve o efeito esperado. No caso particular da experiência 2, uma diminuição da turvação não resultou num aumento da eficácia, pois apenas foi mais eficaz que a experiência 3 onde se

usou o caudal com maior valor neste estudo. E sendo que se utilizou o mesmo caudal que na experiência 1 o decréscimo deveria ser tanto ou menor que o da referida experiência. Tal não se verificou, pressupondo-se que será devido à própria diluição, que de alguma forma terá diminuído a eficácia da radiação ultravioleta.

Em relação à experiência 3, onde se usou o regulador com 2 voltas, relevou-se ir de encontro ao esperado. Ao ter um caudal superior, o tempo de retenção diminui, ou seja, o tempo de contacto das células com a radiação ultravioleta é inferior às outras experiências. Por ter um tempo de retenção menor seria espectável que a eficácia fosse menor, o que se comprova pelos dados experimentais.

A experiência 4 teve o resultado esperado, pois ao fazer 2 passagens no aparelho de ultravioleta, aumenta-se o tempo de contacto para o dobro do usado na experiência 3, com 1,5 voltas. Com esse aumento do tempo de contacto, a penetração da radiação UV será maior e por isso é espectável que a eficácia seja maior.

Relativamente à experiência 5 esta não deu os resultados que eram esperados pois ao fazer 3 passagens deveria dar uma diminuição maior do que se verificou na experiência 4 onde se fez duas passagens. Uma das possíveis explicações foi a variação do caudal ao longo do processo. Isto aconteceu pois é usado ar comprimido para forçar o líquido para sair do recipiente e entrar no aparelho UV. No entanto nas instalações fabris existem várias máquinas que usam ar comprimido em diferentes tempos e isto pode ter feito com que a emissão de ar para o recipiente não tenha sido constante.

O resultado da experiência 6 foi de acordo com o esperado teoricamente, pois houve um decréscimo maior relativamente a todas as outras experiências. No entanto, era previsto ser um decréscimo mais acentuado em relação à experiência 1. Tal não se verificou, possivelmente pelas características do aparelho, que ao ter alguma turvação perde eficácia e como a contagem desta experiência foi superior á da experiência 1, isso pode ter inviabilizado uma aplicação mais eficaz, pois tal como sugerido por Rizzotti *et al.* (2015), a quantidade celular pode influenciar a eficácia do processo. Também o método de contagem não foi o mais adequado, pois é feita uma sobre estimativa da concentração celular.

O próprio aparelho é desenhado para tratamento de água, funcionando melhor com líquidos límpidos (ao contrário do que a experiência 2 indica), ou seja, a fraca diminuição em todas a experiências pode ser justificada pelo facto do mosto a fermentar apresentar pouca limpidez. Esta pouca limpidez do mosto deve-se não só às suas características intrínsecas, mas também devido à grande quantidade de leveduras que estavam no meio. Outro fator a ter em consideração é o método de amostragem, o qual pode não

ter sido o melhor e pode ter influenciado a determinação da eficácia, pois retirar 5 mL de um total de 16 L pode não ser representativo.

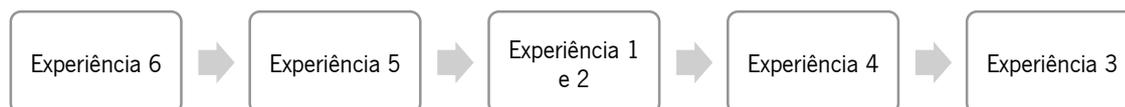
#### **4.6. Cálculo da dosagem da radiação ultravioleta**

Usando como referência as fórmulas de cálculo usadas (Anexo 10) por Keyser *et al.* (2008) é possível calcular a intensidade, a dosagem e a dosagem por volume da radiação ultravioleta usada nos ensaios, apresentada na Tabela 4.

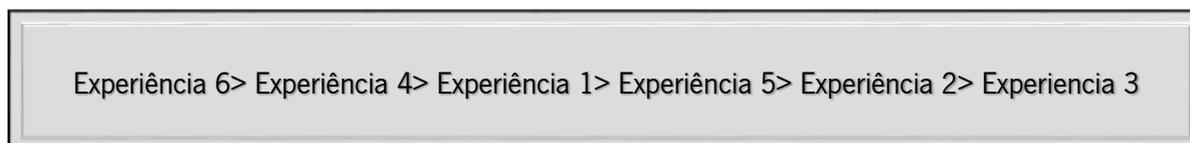
Tabela 4: Resultados da dosagem por unidade de área ( $D$ ) e dosagem por volume ( $D_v$ ) da radiação UV para cada experiência

	$D/(J/cm^2)$	$D_v/(J/L)$
Experiência 1	12,64	2200,00
Experiência 2	12,64	2200,00
Experiência 3	4,21	733,33
Experiência 4	8,43	733,33
Experiência 5	12,64	733,33
Experiência 6	25,28	2200,00

Ao seguir a ordem de grandeza da dosagem de cada experiência tem-se a eficácia que seria esperada teoricamente, ou seja:



No entanto o que foi comprovado experimentalmente é que a ordem de eficácia é a seguinte:



A comparação destes dados indica que no caso específico dos ensaios realizados, uma maior dosagem não significa uma maior eficácia na eliminação, ao contrário do que é sugerido por Fredericks *et al.* (2011) em que uma maior dosagem significa um decréscimo mais acentuado de microrganismos. Esta ordem difere da indicada pela dosagem, pois foi afetada por vários fatores que em determinadas

experiências possam ter levado à não penetração constante da radiação ultravioleta, como a variação de caudal, que pode de certa forma favorecer a penetração da radiação em determinadas zonas do mosto, mas desfavorecer noutras. Outro fator pode ser uma possível diferença na turbidez em diferentes zonas do mosto, devido a partículas ou aglomerações de leveduras devido ao facto de, para se fazer 2 ou 3 passagens, ter de se transferir o mosto do bidão para o recipiente, ou devido à enorme quantidade presente no mosto em fermentação. Esta diferença na turbidez devido a partículas ou células pode como indica Rizzotti *et al.* (2015) agir como uma barreira, impedindo a radiação ultravioleta de penetrar eficazmente no mosto. Pode ainda ter existido fatores ambientais que podem afetar as próprias leveduras e modificar a eficácia do processo, sem esquecer ainda a capacidade de *S. cerevisiae* de produzir proteínas de resistência à radiação UV, como mecanismo de reparação interna. Esta capacidade pode ter um papel mais importante nas experiências em que se fez mais de uma passagem, pois pode corresponder a uma resposta da levedura a um fator de *stress*, diminuindo assim o efeito na segunda ou terceira passagem. Por outro lado existiram ainda possíveis erros no método de amostragem e de contagem que possam ter influenciado a determinação da eficácia, como a possibilidade de as leveduras se depositarem e a agitação ao fazer a amostragem não ter sido suficiente para as colocar em suspensão, ou como já foi referido no subcapítulo 4.4, a quantidade de amostra não ser representativa.



## **5. Conclusões**

Os resultados obtidos para a dessulfitação do mosto, permitem afirmar com clareza que a adição de peróxido de hidrogénio é eficaz e bastante útil. No entanto, pode revelar ter alguns problemas, como a possibilidade de formação de compostos nocivos para a saúde, nomeadamente ácido sulfúrico. Pelos resultados apresentados, embora exista um aumento da acidez que corrobora a formação de ácido sulfúrico, não se verifica uma formação excessiva (pois a análise aos sulfatos revela que está dentro dos limites legais). Contudo, tendo em conta a complexidade do vinho, outros compostos podem ser formados. É importante acompanhar e verificar se o mosto tratado com peróxido de hidrogénio está dentro dos parâmetros legais.

Os resultados permitem concluir que o tratamento com radiação ultravioleta de facto elimina leveduras. Neste caso específico a eficácia não é elevada, pois o aparelho não é o mais adequado e existiram alguns fatores atenuantes. A experiência com maior eficácia é aquela em que se faz uma dupla passagem com o menor caudal, ou seja, com o maior tempo de retenção e a que apresentou menor eficácia foi a experiência em que se fez uma única passagem com o maior caudal, ou seja, com o menor tempo de retenção. Indica assim que quanto maior for o tempo de contacto, maior será o efeito da radiação ultravioleta e maior será a eficácia.

No entanto, ao contrário do que é sugerido pela literatura, uma maior dosagem não significa uma maior eficácia. Tal como a baixa eficácia, este facto pode ser provocado por vários fatores como a variação do caudal ao longo de determinadas experiências, possíveis aglomerações de leveduras, o que pode ter aumentado a turbidez do mosto. O facto de a levedura ser capaz de produzir proteínas que aumentam a sua resistência à radiação ultravioleta, pode ter um papel importante especialmente nas experiências em que foi feita mais que uma passagem.

Embora não se consiga identificar com clareza um fator preponderante para a baixa eficácia, pode-se afirmar que uma combinação de fatores como a elevada turbidez do mosto, juntamente com as características do aparelho são aqueles que mais se destacam para justificar a débil eliminação das células. No entanto, é perceptível que a radiação tem um efeito negativo na viabilidade celular, conseguindo reduzir a carga microbiana.

Sugere-se que no futuro mais testes sejam feitos com mosto e vinho perante a mesma radiação, para fazer uma melhor comparação de resultados e averiguar em qual estado (mosto ou vinho) a radiação é

mais eficaz. No caso particular do vinho existem determinados fatores de *stress* que, como a presença de etanol, podem ter um efeito significativo na eficácia da radiação UV, pois torna as células mais suscetíveis ao dano nas membranas. Isto pode ser um fator determinante, visto que este processo foi aplicado em mosto a fermentar, ou seja, a concentração de etanol não suficientemente elevada para ter um efeito na eficácia.

De modo a aumentar a eficácia pode ainda sugerir-se tornar o regime turbulento, por exemplo pela colocação de anteparos no espaço onde se encontra o líquido, pois permite um maior tempo de contacto e uma melhor mistura das partículas, assegurando uma igualdade na exposição à radiação ultravioleta. Pode-se também fazer diminuição do espaço entre a lâmpada e a parede que limita esse mesmo espaço, reduzindo a espessura do “filme” do líquido, permitindo uma melhor penetração da radiação ultravioleta.

Sugere-se ainda um estudo mais aprofundado em termos microbiológicos, através da utilização da inoculação em placas de Petri, permitindo assim aferir uma estimativa para o tempo de armazenamento máximo de um mosto e/ou vinho tratado com este método.

Existe também a possibilidade de usar outros métodos alternativos para obter o resultado pretendido com a utilização da radiação ultravioleta. Destacam-se o aquecimento óhmico e os pulsos elétricos. Estes dois métodos estão a ser cada vez mais utilizados em investigações em alimentos, pelo que poderão ser métodos com bastante informação e uma variedade de possibilidades.

## **Bibliografia**

- Alegria, E. G., Lopez, I., Ruiz, J. I., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., & Ruiz - Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol Lett*, 230, 53–61.
- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J., & Guilloux-Benatier, M. (2004.) *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int J Food Microbiol*, 93, 141–154.
- Anderson, E. (1990). *U.S. Patent No. 4,971,687 A*. U.S. Patent and Trademark Office. Disponível em: <http://www.google.com/patents/US4971687>
- Antonini, S. R. C. (2004). Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria. Caderno de auxílio às aulas. Araras-SP: Universidade Federal de São Carlos. 33p.
- Barbe, J. C., De Revel, G., Joyeux, A., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (2001). Role of botrytized grape microorganisms in SO<sub>2</sub> binding phenomena. *J Appl Microbiol*, 90, 34–42.
- Barnett, J. A. (2003). A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. *Yeast*, 20, 509–543.
- Barre, P., Blondin, B., Dequin, S., Feuillat, M., Sablayrolles, J. M., & Salmon, J. M. (1998). La levure de fermentation alcoolique. In C. Flanzy (Ed.), *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques* (pp. 454–497). Paris: Tec Doc Lavoisier.
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., & Pretorius, I. S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Res*, 7, 683–689.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R., (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry—A critical review. *J Sci Food Agric*. 80, 637–645.
- Bisson, L. F., & Joseph C. M. L. (2009). Chapter 3: Yeast. In H. König, G. Uden, J. Fröhlich, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in wine*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1999). Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In R. B. Boulton (Ed.), *Principles and Practices of Winemaking* (pp. 102-192). New York: Chapman & Hall.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (2001). Principles and Practices of Winemaking (Chinese trans.). Beijing: China Light Industry Press.
- Branco, M. R., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Antunes, F. (2004). Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. 279, 6501–6506.
- Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E., & Gustin, M. C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259, 1760–1763.
- Britz, T. J. & Tracey, R. P. (1990). The combination effect of pH, SO<sub>2</sub>, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 23–31.

- Byczkowski, J. Z., & Gessner, T. (1988). Biological role of superoxide ion-radical. *Int J Biochem*, 20, 569–580.
- Campos, F. M., Couto, J. A., & Hogg, T. A. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *J Appl Microbiol*, 94, 167–174.
- Chang, I. S., Kim, B. H., & Shin, P. K. (1997). Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 6, 1–6.
- Choe, E., & Min, D. B. (2005). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Journal of Food Science*, 70(9), 142–159.
- Ciani, M., & Maccarelli F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 199 –203.
- Comitini, F., Ferretti, R., Clementi, F., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2005). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol*, 99,105–111.
- Crabtree, H. D. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.*, 23, 536–545.
- Curvelo-Garcia, A. S. (1988). *Controlo de qualidade dos vinhos: Química Enológica- Métodos analíticos*. 1ª edição. Lisboa: Instituto da Vinha e do Vinho.
- CVRVV- Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes. (2015). Como se faz o Verde. Disponível em: <http://www.vinhoverde.pt/pt/como-se-faz-o-verde>
- De Ley, J., Gossele, F., & Swings, J. (1984). Genus I *Acetobacter*. In: N.R. Krieg, J.G. Holt (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, pp. 268–27.
- Delanoë, D., Maillard, C., & Maisondieu, D. (1984). *Le Vin: de l'analyse à élaboration*. Paris: Technique et documentation.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., & Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60,233–242.
- Diaz, D. (2015) Protocolo. Consultado em setembro, 2015 em: [http://2.bp.blogspot.com/\\_jtGoEH\\_cel8/S9F2E5mTbNI/AAAAAAAAABI/JfKA58hqWB8/s1600/Camara\\_de\\_Neubauer-2.jpg](http://2.bp.blogspot.com/_jtGoEH_cel8/S9F2E5mTbNI/AAAAAAAAABI/JfKA58hqWB8/s1600/Camara_de_Neubauer-2.jpg)
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., & Collins, M. D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 395–397.
- Dittrich, H. H. (1977). *Mikrobiologie des Weines, Handbuch der Getränketechnologie*. Ulmer, Stuttgart, Germany.
- Du Toit, M. & Pretorius, I. S. (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal— a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21, 74–96.
- Du Toit, W. J., & Pretorius, I. J. (2002). The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Ann Microbiol*, 52, 155–179.

- Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., & Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.*, 98, 862–871.
- Elias, R. J., & Andersen, & Waterhouse, A. L. (2010). Controlling the Fenton reaction in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1699–1707.
- Falguera, V., Pagan, J., & Ibarz, A. (2011). Effect of UV irradiation on enzymatic activities and physicochemical properties of apple juices from different varieties. *LWT-Food Sci Technol*, 44, 115–119.
- Falguera, V., Pagan, J., & Ibarz, A. (2013). UV-vis irradiation: An alternative to reduce SO<sub>2</sub> in white wines?. *LWT- Food Science and Technology*, 51, 59-64.
- Figueiredo, A. R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T., & Couto, J. A. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiol*, 25, 105–112.
- Fleet, G. H., & Heard, G. M. (1993). Yeasts – growth during fermentation. In: G. H. Fleet (ed) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood, Australia, pp 27–54.
- Fleet, G. H. (1998). The microbiology of alcoholic beverages. In: B. J. B. Wood (ed) *Microbiology of Fermented Foods*, Blackie, Glasgow, pp 217–262.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 11–22.
- Fornairon-Bonnefond, C., Aguera, E., Deytieux, C., Sablayrolles, J.-M., & Salmon, J. M. (2003). Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. *J. Biosci. Bioeng.*, 95, 496–503.
- Fredericks, I. N., du Toit, M., & Krugel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiol*, 28(3), 510–517.
- Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*, 2<sup>a</sup> Ed. New York: Springer.
- Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A. A., Clark, I., Nino, I., Gosset, G., & Martinez, A. (2004). Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, 734–741.
- Gancedo, J. M. (1988). La regulation du metabolisme des sucres chez la levure. In P. Bidan & J. R. Bonneville (Eds.), *Application à l'œnologie des progrès récents en microbiologie et en fermentation* (pp. 133–143). Paris: OIV.
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P., Powell, C. D., & Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Ver*, 31, 535–569.
- Guerrero-Beltrán, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. V., (2004). Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Science and Technology International*, 10, 137–148.
- Guerrero-Beltrán, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. V., (2005). Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. *Journal of Food Process Engineering*, 28, 437–452.

- Guillamón, J. M., & Mas, A. (2009). Chapter 2: Acetic Acid Bacteria. In H. König, G. Uden, J. Fröhlich, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in wine*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Guilloux-Benatier, M., Remize, F., Gal, L., Guzzo, J., & Alexandre, H. (2006). Effects of yeast proteolytic activity on *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation. *FEMS Microbiol Lett*, 263, 183–188.
- Guzzo, J., & Desroche, N., (2009). Chapter 16: Physical and Chemical Stress Factors in Lactic Acid Bacteria. In H. König, G. Uden, J. Fröhlich, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in wine*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Guzzo, J., Jobin, M. P., & Divies, C. (1998). Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiol Lett*, 160, 43–47.
- Hallsworth, J. E. (1998). Ethanol-induced water stress in yeasts. *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 125–137.
- Hammes, W. P., Weis N., & Holzapfel, I. W. P. (1991). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer (eds.) *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer, New York, pp 1535–1594.
- Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 727–728.
- Hensche, P. A., & Jiranek, V. (1993). Yeast – metabolism of nitrogen compounds. In G.H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (pp. 77–164). Reading: Hrawood Academic.
- Hoffman, M. R., & Edwards, J. O. (1975). Kinetics of the Oxidation of Sulfite by Hydrogen Peroxide in Acidic Solution. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol 79, No 20.
- Holzapfel, W. H. & Schillinger, U. (1992). The genus *Leuconostoc*. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, & K. H. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes*, 2nd edition, Volume II, Chapter 69, pp. 1508–1534. Springer-Verlag, New York, NY.
- Hutkins, R. W., Nannen, N. (1993). pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, 76, 2354–2365.
- Infovini. (2015a). Vinhos Verdes. Consultado em setembro, 2015 em: <http://www.infovini.com/classic/pagina.php?codPagina=64&regiao=1>
- Infovini. (2015b). Recursos multimédia. Consultado em setembro, 2015 em: <http://www.infovini.com/classic/pagina.php?codPagina=87#>
- Ivorra, C., Perez-Ortin, J. E., & del Olmo, M. (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnol Bioeng*, 64, 698–708.
- Jackson, R. S. (2008). Chapter 7: Fermentation. In: *Wine Science: Principles and Applications*. Oxford, Reino Unido: Elsevier.
- Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 14, 1511–1527.
- Jürgen, J., & Rodicio, R. (2009). Chapter 15: Physical and Chemical Stress in Yeast. In H. König, G. Uden, J. Fröhlich, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in wine*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209–224.

- Keyser, M., Müller, I. A., Cilliers, F. P., Nel, W., & Gouws, P. A. (2008). Ultraviolet radiativo as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 348–354.
- Kitamoto, K. (1989). Role of yeast vacuole in sake brewing (in Japanese) *J. Brew. Soc. Japan*, 84, 367–374.
- König, H., & Fröhlich, J. (2009). Chapter 1: Lactic Acid Bacteria. In H. König, G. Unden, J. Fröhlich. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in wine*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Krieger, S. A., Hammes, W. P., & Henick-Kling, T. (1990). Induction of malo-lactic fermentation under practical wine-making conditions. *Vin Win Manage Nov/Dec*, 45–50.
- Kunkee, R. E. (1991). Relationship between nitrogen content of must and sluggish fermentation. In *Proceedings of the International Symposium of Nitrogen in Grapes and Wine*, 18–19 de June de 1991, Seattle, Washington (pp. 148–155). Davis CA: American Society of Enology and Viticulture.
- Labas, M. D., Zalazar, C. S., Brandi, R. J., & Cassano, A. E. (2007). Reaction Kinetics of Bacteria Disinfection Employing Hydrogen Peroxide. *Biochemical Engineering Journal*.
- Lafon-Lafourcade, S. (1983). Wine and brandy. Biotechnology, In H. J. Rehm & G. Reed. (Eds.), *Food and Feed Production with Microorganisms*, 5, (81–163).
- Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., & Ribereau-Gayon, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environm. Microbiol.*, 47, 1246–1249.
- Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A., & Sáez, M. J. (1982). Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.*, 152, 19–25.
- Lagunas, R., & Gancedo, C. (1983). Role of phosphate in the regulation of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 137, 479–483.
- Leite, S. (2015a). Medição do SO<sub>2</sub>. *Instruções de trabalho Vinhos Norte*.
- Leite, S. (2015b). Medição da acidez. *Instruções de trabalho Vinhos Norte*.
- Llauradó, J., Rozés, N., Bobet, R., Mas, A., & Constantí, M. (2002). Low temperature alcoholic fermentations in high sugar concentration grape musts. *J Food Sci.*, 67, 268–273.
- Lonvaud-Funel, A. (1995). Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbiol Lett*, 126, 209–214.
- Mattos, I. L., Shiraishi, K. A., Braz, A. D., & Fernandes, J. R. (2003). Peróxido de hidrogenio: importância e determinação. *Quim. Nova*. 26, 373–380.
- Miller, R., Jeffrey, W., Mitchell, D., & Elasm, M. (1999). Bacteria responses to ultraviolet light. *American Society for Microbiology*, 65, 535– 541.
- Molina-Gutierrez, A., Stippl, V., Delgado, A., Ganzle, M. G., & Vogel, R. F. (2002). In situ determination of the intracellular pH of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum* during pressure treatment. *Appl Environ Microbiol*, 68, 4399–4406.
- Nassau, R. (1998). UV “green” light disinfection. *Dairy Ind. Int.*, 54, 33-35.

- OIV - Organização Internacional da Vinha e do Vinho (International Organisation of Vine and Wine). (2013) Section 4: Microbiological Analysis of Wines and Must. In *Compendium Of International Methods Wine and Must Analysis*. Vol.1. 3ª Edição. Paris.
- Ough, C. S., (1964). Fermentation rates of juice. I. Effects of temperature and composition on white juice fermentation rates. *Am. J. Enol. Vitic.*, 15, 167–177.
- Ough, C. S. (1966). Fermentation rates of grape juice, II. Effects of initial °Brix, pH, and fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.*, 17, 20–26.
- Ough, C. S. (1993). Sulfur dioxide and sulfites. In: *Antimicrobials in Foods*. P. M. Davidson & A. L. Branen (Eds.), 2nd edition, Chapter 5, pp. 137–190. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Pasteur, L. (1861). Influence de l'oxygène sur le developpement de la levûre et la fermentation alcoolique. *Bulletin de la Société de Paris (Résumé de Séance du 28 juin 1861)*, 79–80.
- Penna, T. C. V., Mazzola, P. G., & Martins, A. M. S. (2001). The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infectious Diseases*, 1, 16.
- Pretorius, I. S., Van der Westhuizen, T. J., & Augustyn, O. P. H. (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 20, 61–74.
- Prieto, C., Jara, C., Mas, A., & Romero, J. (2007). Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *Int J Food Microbiol*, 115, 348–355.
- Pure Water Products, LLC. (2015). The Pura UV20 Series. Disponível em: <http://www.purauv.com/purauv20.htm>
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., & Ramón, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2948–2953.
- Qiu, J., Guan, M. X., Bailis, A. M., & Shen, B. (1998). Saccharomyces cerevisiae exonuclease- 1 plays a role in UV resistance that is distinct from nucleotide excision repair. *Nucl. Acids Res.*, 26, 3077-3083.
- Ratledge, C., & Evans, C. T. (1989). Lipids and their metabolism. In A. H. Rose & J. S. Harrison (Eds.), *The Yeasts* (2nd ed.), Vol 3 (pp. 367–455). London: Academic Press.
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Aust J Grape Wine Res*, 11, 316–327.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006a). Handbook of enology, 2nd ed., vol. 1, The microbiology of wine and vinifications. John Wiley, Chichester.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006b). Conditions of yeast development. In P. Ribéreau-Gayon (Ed.), *Handbook of Enology*, Vol 2, (pp. 75–107) Chichester: John Wiley & sons, Ltd.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (1998). Les Bacterie acetiques. In: Dunod (ed), *Trait d'enologie. Microbiologie du vin. Vinifications*. Editions La Vigne, Paris, pp. 225–236.
- Ribéreau-Gayon, P. (1985). New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 1–9.

- Rizzotti, L., Levav, N., Fracchetti, F., Felis, G. E., & Torriani, S. (2015). Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. *Food Control*, 47, 407-412.
- Rodicio, R., & Heinisch, J. J. (2009). Chapter 6: Sugar Metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Yeasts. In H. König, G. Uden, J. Fröhlich, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in wine*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Romano, P., & Suzzi, G. (1993). Sulphur dioxide and wine microorganisms. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), Chapter 13, pp. 373–393. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1986). Evaluation des besoins en oxygène de fermentations alcooliques en conditions œnologiques. *Sci. Aliments*, 6, 373–383.
- Sanders, J. W., Venema, G., & Kok, J. (1999). Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev*, 23, 483–501.
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234, 1-12.
- Sapis-Domerq, S. (1980). Étude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. *Conn. Vigne Vin*, 14, 155–181.
- Schulze, U., Lidén, G., Nielsen, J., & Villadsen, J. (1996). Physiological effects of nitrogen starvation in anaerobic batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 142, 2299–2310.
- Schnürer J., Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Technol*, 16, 70–78.
- Shama, G., (1999). Ultraviolet light. In . K. Robinson, C. Batt and P. Patel (eds.), *Encyclopedia of food microbiology-3* (R) pp. 2208–2214, Academic Press, London, UK.
- Shimizu, K. (1993). Chapter 8: Killer yeasts. In: G. H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. pp. 243–264. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Sizer, C. E., & Balasubramaniam, V. M., (1999). New intervention processes for minimally processed juices. *Food Technology*, 53, 64–67.
- Snowball, M. R. & Hornsey, I. S. (1988). Purification of water supplies using ultraviolet light. In R. K. Robinson & U. K. Barking (Eds.), *Developments in Food Microbiology* (pp. 171-191). Elsevier: Applied Science, London.
- Stoother, B. (1999). UV disinfection in liquid sugar. *International Sugar Journal*, 101, 361– 363.
- Tannock, G. (2005). *Probiotics and prebiotics: Scientific aspects*, 1st ed. Caister Academic, Wymondham.
- Technical Services Group. (2007). TN06—Removal from and addition of sulfur dioxide to must, juice and wine. *Technical Note*.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2009). Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends Food Sci Technol*, 20, 137–145.

- Tran, M. T. T., & Farid, M., (2004). Ultraviolet treatment of orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 495–502.
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Anton Leeuw*, 82,187–216.
- Van Vuuren, H. J. J., & Jacobs, C. J. (1992). Killer yeasts in the wine industry: a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 119–128.
- Versari, A., Parpinello, G. P., & Cattaneo, M. (1999). *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 23,447–455.
- Viegas, C. A., Almeida, P. F., Cavaco, M., & Sá-Correia, I. (1998). The H-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in octanoic acid supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 779–783.
- Vinhos Norte. (2015). *Homepage*. Disponível em: <http://www.vinhosnorte.com/>
- Watanabe, M., & Lino, S. (1984). Studies on bacteria isolated from Japanese wines. In: Yamanashiken. Sokuhin. Koyo. Shidojo. Kenkyu. Hokoku., *Growth of the Acetobacter sp. A-1 During the Fermentation and the Storage of Grape Must and Red Wine*. Part 2. 16,13–22.
- Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57,306-313.
- Weber, F. J., & de Bont, J. A. (1996). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1286, 225–245.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C., Fleet, G. H., & Lee, T. H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine – a review. *Am J Enol Vitic*, 36, 302–312.
- Wibowo, D., Fleet, G. H., & Lee, T. H., Eschenbruch, R. (1988). Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wine. *J Appl Bacteriol*, 64, 421–428.
- Wine Institute. 2013. World Statistics. Consultado em Setembro, 2015 em: <http://www.wineinstitute.org/resources/statistics>
- Zamora, F. (2004). Las paradas de fermentación. *Enólogos*, 29, 28–3.
- Zamora, F. (2009). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer.

## **Anexos**

- A. Anexo 1: Medição da acidez Total
- B. Anexo 2: Validação microbiológica
- C. Anexo 3: Utilização da Câmara de Neubauer
- D. Anexo 4: Procedimento para a medição da concentração de SO<sub>2</sub> Livre e Total
- E. Anexo 5: Exemplo de cálculo para a dessulfitação do mosto
- F. Anexo 6: Mapa de controlo de fermentação
- G. Anexo 7: Compilação de orçamentos requeridos
- H. Anexo 8: Relatório do estudo da concentração de sulfatos no mosto dessulfitado com peróxido de hidrogénio
- I. Anexo 9: Exemplo de cálculo de contagem através da câmara de Neubauer
- J. Anexo 10: Cálculo da Intensidade, dosagem e dosagem por volume

### **Anexo 1: Medição da Acidez Total**

Para vinhos gaseificados: Previamente ao ensaio, deve ser retirada a maior quantidade possível de dióxido de carbono, através da sua agitação no banho de ultrassons.

Para todos os vinhos: Previamente a qualquer ensaio, a amostra deve ser levada a aproximadamente 20 °C utilizando o banho-maria (Leite, 2015b).

1. Transferir para um balão cilíndrico 30 mL de água destilada, 1 mL de solução de Azul de Bromotimol e 10 mL de amostra do vinho analisar.
2. Adicionar solução 0,1 mol/L de Hidróxido de Sódio, até à obtenção de uma coloração Azul-Verde.

Expressão da acidez total, expressa como ácido tartárico ( $AT_{\text{acidtart}}$ ):

$$\frac{AT_{\text{acidtart}}}{\text{g/L}} = (n \times 10) \times 0.075$$

(sendo  $n$  o volume titulado)

## Anexo 2: Validação microbiológica

No sentido de perceber a existência de microrganismos viáveis, procedeu-se à preparação do meio YPD e de água peptonada para fazer inoculações em placas de Petri.

Para fazer 400 mL de meio YPD foi necessário os reagentes presentes na Tabela A.1.

Tabela A.1: Lista de ingredientes e massas (*m*) para fazer o meio YPD

Reagente	<i>m</i> /g
Extrato de levedura	4
Peptona	8
Glucose monohidratada	8,8
Agar	8

\*com a glucose monohidratada é necessário fazer cálculos para saber a massa exata a adicionar:

$$m_{\text{glucose}} = \frac{198 \text{ g/mol} \times 8 \text{ g}}{180,16 \text{ g/mol}} = 8,8 \text{ g}$$

Massa molar de glucose monohidrata= 198,16 g/mol

Massa molar de glucose anidra=180,16 g/mol

Água peptonada: Misturar 1 g de peptona com 1000 mL de água destilada.

O meio e a água peptonada foram autoclavados a 121 °C durante 15 min.. Posteriormente verteu-se o meio para as placas e após arrefecer fez-se inoculação de 3 placas de Petri sem diluição, com diluição 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup>, deixando-se a incubar durante 3 d, como é possível ver pela Figura A.1. Ao fim deste período foi investigada a existência de colónias.

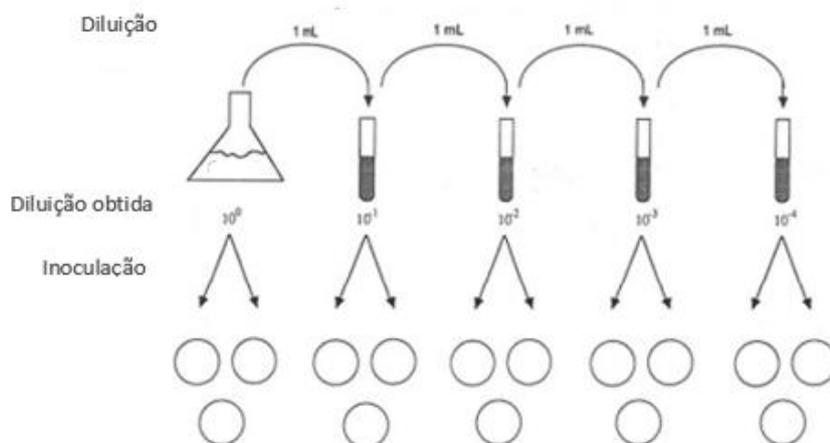


Figura A. 1: Preparação das diluições e inoculações (Adaptado de OIV, 2013).

### **Anexo 3: Utilização da Câmara de Neubauer**

A câmara de Neubauer (Figura A.2) é uma lâmina de vidro especializada, com duas subcâmaras, cada uma está dividida em 9 retículos com quadrículos gravados, de área e profundidade conhecidos, que delimitam volumes precisos da amostra.

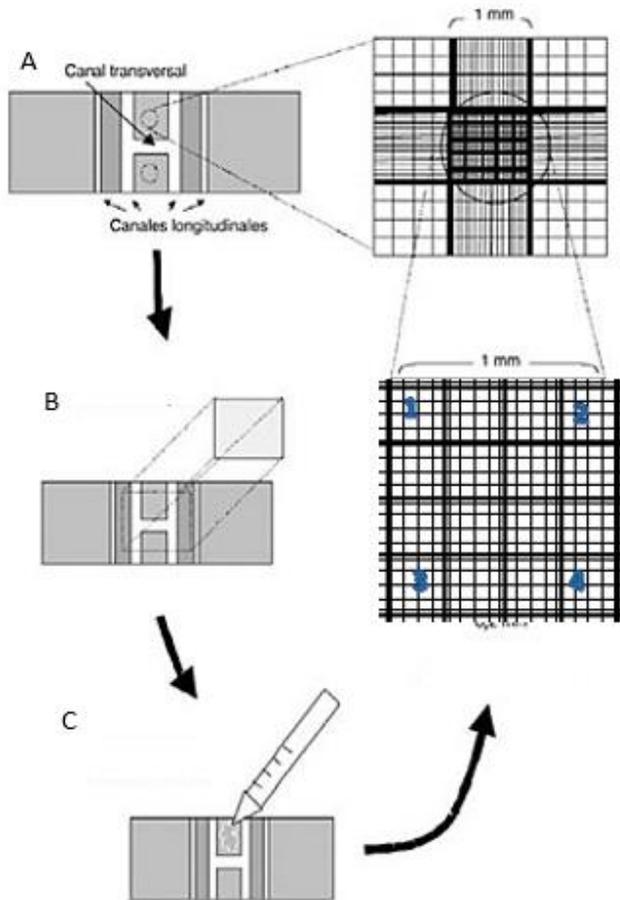


Figura A. 2: Câmara de Neubauer ou Hematocítmetro (Adaptado de Diaz, 2015).

O quadrículo central interno está dividido em 16 quadrados mais pequenos de 0,2 mm de lado. Estes quadrados mais pequenos encontram-se ainda divididos em 16 quadradinhos de 0,05 mm de lado. Como a altura da câmara é 0,1 mm, então o volume de cada quadradinho do retículo central é  $0,25 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ .

A contagem foi feita antes e após o tratamento com radiação ultravioleta. Em ambas as contagens, as leveduras foram sujeitas a uma coloração com azul-de-metileno. Esta coloração permite determinar as células viáveis, ou seja, células que são capazes de se reproduzir, pois o corante fica preso nas células sem capacidade de reprodução deixando-as com uma cor azul, enquanto as células com atividade metabólica e capacidade de reprodução permanecem incolores.

## **Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre**

Inicialmente procedeu-se à limpeza da câmara de Neubauer e da lamela com álcool e 2 min após a preparação da suspensão de amostragem, usando uma pipeta de Pasteur, despejou-se umas gotas entre a lâmina e a lamela para que toda a lâmina ficasse humedecida com a amostra (adaptado de Antonini, 2004). De seguida, procedeu-se à observação e contagem, no microscópio, das células que se encontram nos 4 quadrados maiores do retículo central, como indicado na Figura A.2. Tendo em conta o volume e a diluição da amostra, contando o número de células em cada espaço, pode determinar-se o número de microrganismos da amostra.

#### **Anexo 4: Procedimento para a medição da concentração de SO<sub>2</sub> Livre e Total**

Preparação da amostra:

Para todos os vinhos: previamente a qualquer ensaio, a amostra deve ser levada a aproximadamente 20 °C, utilizando o banho-maria (Leite, 2015a).

Medição do SO<sub>2</sub> Livre

1. Introduzir num gobelé 25 mL de vinho e 5 mL de ácido sulfúrico diluído 1/3;
2. A descida da bureta efetua-se pressionando o botão “TITRATION” com pressões sucessivas;
3. O fim da titulação é assinalado pelo deslocamento brusco da agulha do medidor acima da graduação 10, pelo menos durante 5 s;
4. Ler na bureta a quantidade de solução de titulação consumida ( $n$ ); sendo o resultado de concentração ( $C$ ):  $C / (\text{mg/L}) = n \times 20$ .

Medição do SO<sub>2</sub> Total

1. Introduzir num gobelé 10 mL de vinho e 2 mL de hidróxido de sódio 2 mol/L;
2. Deixar repousar 5 min e juntar 20 mL de ácido sulfúrico diluído 1/10;
3. Ler na bureta a quantidade de solução de titulação consumida ( $n'$ ); sendo o resultado em

$$\frac{C_{\text{SO}_2\text{total}}}{\text{mg/L}} = n' \times 50$$

Deve-se realizar 2 ensaios para excluir possíveis erros do utilizador.

**Anexo 5: Exemplo de cálculo para a dessulfitação do mosto.**

Por exemplo se se tem um mosto com 3 L de volume com 300 mg/L de SO<sub>2</sub> Livre e se quer reduzir para metade.

$$m_{\text{SO}_2} = \left(\frac{300}{2}\right) \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 90 \% \times 3 \text{ L} = 405 \text{ mg} = 0,405 \text{ g}$$

Os 90 % são utilizados para conferir uma margem de 10 % de segurança.

Calcular a quantidade correspondente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

$$C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,405 \text{ g} \times \frac{34 \text{ g/mol}}{64 \text{ g/mol}} = 0,2152 \text{ g}$$

- Massa molecular de SO<sub>2</sub>: 64 g/mol
- Massa molecular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 34 g/mol

Passar a massa de peróxido de hidrogénio para volume:

Usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com 35 g/L, isto significa que por exemplo 35 g em 100 mL (ou 35 %). Então:

$$0,2152 \text{ g} \times \frac{100 \text{ mL}}{35 \text{ g}} = 0,61 \text{ mL}$$

Adiciona-se 0,6 mL de peróxido de hidrogénio ao mosto.

No texto original (Technical Services Group, 2007), o cálculo é efetuado com o SO<sub>2</sub> Livre. No entanto, o pretendido não é apenas retirar uma parte do sulfuroso, mas sim a sua totalidade, para desta forma trabalhar seguidamente com mosto “fresco”. Por isso procedeu-se a uma adaptação: usar no cálculo a quantidade de SO<sub>2</sub> Total em vez de usar apenas a parte livre. Embora nunca se consiga retirar na totalidade, pretende-se retirar o máximo possível.

Exemplo de cálculo para a 1ª adição indicada no subcapítulo 4.2:

Volume=1000 L

SO<sub>2</sub> Total=1325 mg/L

$$1325 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 90 \% \times 1000 \text{ L} = 1192,5 \text{ g}$$

$$1192,5 \text{ g} \times \frac{34 \text{ g/mol}}{64 \text{ g/mol}} = 633,51 \text{ g}$$

**Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre**

$$633,51 \text{ g} \times \frac{100 \text{ mL}}{35 \text{ g}} = 1810,045 \text{ mL}$$

Adicionou-se 1,8 L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Anexo 6: Mapa de controlo de fermentação**

Mapa de controlo de fermentação. Parte onde se coloca as informações sobre o vinho/mosto que se pretende controlar. Na Figura A.3 é indicado os dados sobre o vinho em causa, de forma a poder identificar a que cuba e a que possível lote o vinho pertence. Permite fazer uma rastreabilidade do vinho.

**Mapa de Controlo de Fermentação** CUBA: 10(F)

VNF.MCF.00

Data de Encuba	19/3/15	Quantidade de Mosto	1000 L	Espécie de Vinho	Branca	Cuba(s) de Origem	8
----------------	---------	---------------------	--------	------------------	--------	-------------------	---

ANÁLISES		RESUMO DE TRATAMENTOS		
		Produto	Quantidade	Lote
Grau Provável	9,5			
Acidez Total (g/l)	111			
pH	2,94			
SO <sub>2</sub> Livre (mg/l)	16			

Data	Hora	Densidade (g/dm <sup>3</sup> )	Temp. (°C)	Observações
------	------	--------------------------------	------------	-------------

Figura A. 3: Informações sobre o mosto/vinho em fermentação.

A Figura A.4 indica o acompanhamento da densidade. Permite aferir quando acaba a fermentação.

Data	Hora	Densidade (g/dm <sup>3</sup> )	Temp. (°C)
19/3/15	18:00	1072	20
20/3/15	15:00	1074,5	19
20/3/15	17:15	1072,5	20
23/3/15	11:45	1065	19
23/3/15	16:45	1062	20
25/3/15	15:00	1027	20
26/3/15	15:00	1003	19,5
27/3/15	11:35	997,2	20
30/3/15	15:00	997,0	20

Figura A. 4: Acompanhamento da fermentação.

## **Anexo 7: Compilação de orçamentos requeridos**

As Figuras de A.5 a A.12 indicam os orçamentos pedidos a várias empresas. Através destes orçamentos foi possível fazer uma compilação dos preços dos materiais necessários.

1: Proposta da empresa A para meios de cultura para leveduras.

**Assunto: Orçamento**

Vimos por este meio informar os preços para os produtos solicitados:

Ref.	Artigo	Marca	Emb.	Qtd	Preço/emb.	Preço total
1546	YPD Agar	Condalab	500g	1	44,00	44,00
1194	YM agar	Condalab	500g	1	50,00	50,00
29062	Placa Petri 90 x 16,2 mm vent Estétil	FL medical	480 placas	1 cx	43,20	43,20
IVA de 23% não incluído					<b>Total</b>	<b>137,20</b>

**Prazo de entrega: Imediato**

O valor total da proposta é de 137,20€ acrescido de IVA à taxa em vigor.

**Portes: 10,00 para encomendas inferiores a 50,00 (Portugal Continental) 100,00 (Ilhas).**

Pagamento a 30 dias.

Proposta válida para o ano 2015.

Figura A. 5: *Print Screen* da proposta da empresa A.

## Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre

2: Pesquisa no *site* da empresa B por vários materiais e reagentes.

\*Nota: nem todos os reagentes pedidos correspondem aos que são na realidade pretendidos, daí o recurso a vários orçamentos e mais personalizados para ter essa certeza.

### Cesto de Compras

[Preferências do cesto de compras](#)

Faça Login na página para visualizar o seu preço e disponibilidade dos artigos.

Endereço de E-mail:  [Registo](#)

Palavra-passe:  [Iniciar Sessão](#)

[Expandir tudo](#) / [Esconder tudo](#)

#### Produtos

Descrição	Código de Artigo #	Unidade	Qtd	Preço da Lista	Preço Total
<input type="checkbox"/> Malt Extract Broth 1 * 500 g	<a href="#">84666.0500</a>	1 * 500 g	<input type="text" value="1"/>	47,50 €	47,50 €
<input type="checkbox"/> Yeast Extract 1 * 500 g	<a href="#">84601.0500</a>	1 * 500 g	<input type="text" value="1"/>	23,40 €	23,40 €
<input type="checkbox"/> Malt Extract 1 * 500 g	<a href="#">84618.0500</a>	1 * 500 g	<input type="text" value="1"/>	35,80 €	35,80 €
<input type="checkbox"/> Glucose anhydrous cell culture grade 1 * 1 kg	<a href="#">A0883.1000</a>	1 * 1 kg	<input type="text" value="1"/>	24,30 €	24,30 €
<input type="checkbox"/> Bacteriological Agar 1 * 500 g	<a href="#">84609.0500</a>	1 * 500 g	<input type="text" value="1"/>	36,40 €	36,40 €
<input type="checkbox"/> Autoclave Certoclav CV-EL 12L GS 1 * 1 unid.	<a href="#">481-0076</a>	1 * 1 unid	<input type="text" value="1"/>	1 872,00 €	1 872,00 €
<input type="checkbox"/> Micropipeta variável UHP, 100 - 1000 µL 1 * 1 unid.	<a href="#">613-1493</a>	1 * 1 unid	<input type="text" value="1"/>	217,00 €	217,00 €
<input type="checkbox"/> [EN]TIP PIPET 100-1000µL UNIV BLUE RACK 1 * 1.000 unid.	<a href="#">613-5001</a>	1 * 1.000	<input type="text" value="1"/>	62,67 €	62,67 €
<input type="checkbox"/> Caixa de Petri, standard, 100x15 mm 1 * 500 unid.	<a href="#">391-2002</a>	1 * 500 un	<input type="text" value="1"/>	164,00 €	164,00 €
<input type="checkbox"/> [EN]BURNER ALCOHOL COMPLETE 1 * 1 unid.	<a href="#">HERE1082601</a>	1 * 1 unid	<input type="text" value="2"/>	18,50 €	37,00 €
<input type="checkbox"/> Tryptone (peptona de caseína) 1 * 500 g	<a href="#">84610.0500</a>	1 * 500 g	<input type="text" value="1"/>	33,20 €	33,20 €

Figura A. 6: *Print Screen* do *site* da empresa B.

## Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre

3: Proposta da empresa B para o corante azul-de-metileno.

Pos	Referência Descrição Tipo de embalagem	Quant.	Preço unitário	Preço total
10	 1.59270.0010 Azul de metileno (C.I. 52015) Reag. Ph Eur	1 * 10 g	17,64	17,64
20	 Item alternativo: 10 3470.0025 Azul de metileno (CI52015) p/microscopia	1 * 25 g	9,85	9,85

Condições de pagamento: 90 dias s/ desconto  
Condições de entrega: CIF-Custo Seguro e Frete

<b>Valor da proposta:</b>	<b>Total sem I.V.A.:</b> EUR	<b>17,64</b>
	<b>I.V.A.: 23,0%</b> EUR	<b>4,06</b>
	<b>Total com I.V.A.:</b> EUR	<b>21,70</b>
<b>Valor da proposta com alternativas:</b>	<b>Total sem I.V.A.:</b> EUR	<b>9,85</b>
	<b>Valor do I.V.A.:</b> EUR	<b>2,27</b>
	<b>Total com I.V.A.:</b> EUR	<b>12,12</b>
<b>Redução do valor com alternativas:</b>	<b>EUR</b>	<b>7,79</b>

Processado por computador  
Efetue todas as suas compras de material de laboratório através do nosso site: <http://www.vwr.com>

Figura A. 7: *Print Screen* da proposta da empresa B.

4: Proposta da empresa C para a câmara de Neubauer.

<b>Quant.</b>	<b>Artigos</b>	<b>Valor Unit.</b>	<b>Valor Total</b>
1	Camara de Contagem Neubauer Improved com pinças	47,00	
ou			
1	Camara de Contagem Neubauer Improved sem pinças	32,00	
	IVA + 23%		
	Portes de Envio de vossa conta		
	Validade da Proposta: 30 dias		
	Prazo de Entrega:Imediato		
	Com os nossos melhores cumprimentos		
	Lurdes Martins		
	Vitriab Lda		

Figura A. 8: *Print Screen* da proposta da empresa C.

## Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre

5: Proposta da empresa C para materiais variados.

Quant.	Descrição	Valor Unit.	Valor Total
1	Autoclave MED 12 para esterilização, para temperaturas a 121° C e 134° C, capacidade 12 Litros ref.4001756		
	SELECTA (Conforme folheto em anexo)	2810,00	
1	Frasco de vidro graduado c/tampa azul de rosca 500 ml	2,70	
1	Placas de Petri de plastico de 90 mm Cx 500	38,50	
1	Micropipeta de volume variável "Dispen Var" 100-1000 mc código 5901000	95,00	
1	Pontas de 100 - 1000 em Rack de 96 pontas	5,00	
	IVA+23%		
	Portes de Envio de vossa conta		
	Prazo de Entrega: 2 a 3 semanas		
	Cond. Pagamento: 50% com a encomenda 50% com a entrega		
	Validade da Proposta: 30 dias		
	Com os nossos melhores cumprimentos		
	Lurdes Martins		
	VitriLab Lda		

Figura A. 9: *Print Screen* da proposta da empresa C.

## Preservação de mostos de uvas brancas: alternativas ao dióxido de enxofre

6: Proposta da empresa D para vários materiais.

Artigo	Descrição	Qtd	Un.	Preço Unit.	% Desc.	% Iva	Total
R 04301000002811	AGUA PEPTONADA HI-MEDIA M028 500 GR	1	UN	46.000 EUR		23	46.00 EUR
<small>45/60 DIAS SE DISPONIVEL NA ORIGEM</small>							
R 024041432150022	FRASCOS VIDRO BRANCO T/AZUL 00500ML SIMAX	1	UN	2.800 EUR		23	2.80 EUR
<small>45/60 DIAS SE DISPONIVEL NA ORIGEM</small>							
R 028000001322048	MICROPIPETA DIGITAL VOL.VARIAVEL 100-1000ul PLURIPET II KARTELL	1	UN	74.000 EUR		23	74.00 EUR
<small>IMEDIATO SALVO VENDA</small>							
R 02800000094148	PONTA AZUL P/PIPETA 100-1000ul TIPO GILSON, KARTELL (EMB.1000)	1	EMB	6.650 EUR		23	6.65 EUR
<small>20/30 DIAS SE DISPONIVEL NA ORIGEM</small>							
R	DESKTOP AUTOCLAVES 4001756 - Med-12. SELECTA	1		2705.000 EUR		23	2705.00 EUR
<small>30/45 DIAS SE DISPONIVEL NA ORIGEM</small>							
R 000000000000000	PD-PORTES A DEBITAR NA FACTURA <small>OS PRAZOS DE ENTREGA SÃO INDICATIVOS ESTANDO SUJEITOS À SUA CONFIRMAÇÃO NO ACTO DE ENCOMENDA.</small>	1	UN	8.000 EUR		23	8.00 EUR

Resumo Iva			
Taxa	Incidência	Total Iva	Total
23.00	2,879.35€	662.25€	3,541.60€

Total antes desconto	2879.35
Desconto / Linha	0.00
Desconto / Cliente	0.00
Total Líquido	2879.35
Total de IVA	662.25
<b>Total</b>	<b>EUR 3541.60</b>

Figura A. 10: *Print Screen* da proposta da empresa D.

7: Consulta do preço do *Tomato Juice Agar* no *site* da empresa E.

### Tomato Juice Agar

for microbiology

[MSDS](#)

**Compra** Documentação & Segurança Artigos Revisados por Colegas 0

#### Propriedades

Related Categories	All Dairy Media (alphabetical), All Food Control Media (alphabetical), All Solid Media/Agars, Control Media for Fish, Dairy Culture Media for Bacteria, Mais...
grade	for microbiology
shelf life	limited shelf life, expiry date on the label
composition	agar, 11 g/L
	casein enzymic hydrolysate, 10 g/L
	peptonized milk, 10 g/L
	tomato juice (400 ml) solids, 20 g/L
final pH	6.1±0.2 (25 °C)

[Show More \(9\)](#)

#### Disponibilidade e Preços

SKU - Tamanho da Embalagem	Disponibilidade	Preço (EUR)	Quantidade
17216-500G	Existe apenas 6 em estoque (em breve haverá mais disponível) - DE	234.00	<input type="text" value="0"/>

[Bulk orders?](#) [ADICIONAR AO CARRINHO](#)

Did you use this product in your Paper? If so click here.  
[Set your institution to view full text papers.](#)

Figura A. 11: *Print screen* do *site* da empresa E.

8: Consulta do preço do *Nutrient Agar* no *site* da empresa E.

**Nutrient agar**  
for microbiology

MSDS

POPULAR DOCUMENTS: DATASHEET (PDF)

Compra Documentação & Segurança Artigos Revisados por Colegas 1

### Propriedades

Related Categories	All Food Control Media (alphabetical), All Solid Media/Agars, Bacteria (General Media), Clinical Media, Enterococcus, Mais...
grade	for microbiology
shelf life	limited shelf life, expiry date on the label
pH	6.8±0.2 (25 °C)
suitability	nonselective for Bacteria (General Media)
	nonselective for Enterococcus
	nonselective for Escherichia coli and Coliforms
	nonselective for Salmonella

### Disponibilidade e Preços

SKU - Tamanho da Embalagem	Disponibilidade	Preço (EUR)	Quantidade
N9405-500G	Disponível para enviar no 02.09.15 - DE	166.00	0

Bulk orders?

**ADICIONAR AO CARRINHO**

Did you use this product in your Paper? If so click here.

Set your institution to view full text papers.

Figura A. 12: *Print screen* do *site* da empresa E.

**Anexo 8: Relatório do estudo da concentração de sulfatos no mosto dessulfitado com peróxido de hidrogénio**

A Figura A.13 representa o relatório da análise aos sulfatos pedido a um laboratório externo. Como é possível verificar, o valor apresentado está abaixo do limite legal indicado pela portaria n.º 334/94 de 31 de maio, ou seja, é inferior a 2 g/L (expressos como  $K_2SO_4$ ).

).

Ensaio e Métodos	Resultados
pH (20°C) PE.Q.AC.11 Ed.06	3,33
Acidez (total) (1) NP 2139:1987	8,0 g ác. tartárico/l
Sulfatos (1) AOAC 955.26	0,6 g $K_2SO_4$ /l

Figura A. 13: Digitalização do relatório do estudo da concentração de sulfatos.

**Anexo 9: Exemplo de cálculo de contagem através da câmara de Neubauer**

<b>1 quadradinho</b>	
<b>Profundidade</b>	0,100 mm
<b>Área</b>	0,0025 mm <sup>2</sup>
<b>Volume</b>	0,100 mm×0,0025 mm <sup>2</sup> =0,00025 mm <sup>3</sup>
<b>1 quadrado=16 quadradinhos</b>	
Volume=16×0,00025 mm <sup>3</sup> =0,004 mm <sup>3</sup>	
Volume= 4,0×10 <sup>-9</sup> L	

Tomando o exemplo da contagem antes da aplicação da radiação ultravioleta da experiência 1 tem-se:

Contagem total=201 células

$$\text{Média} = \frac{201}{4} = 50,25$$

Então, sendo  $N$  a concentração celular:

$$N = \frac{50,25}{4,0 \times 10^{-9} \text{ L}^{-1}} = 1,20 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$$

**Anexo 10: Cálculo da Intensidade, dosagem e dosagem por volume**

Usando os seguintes dados, bem como os cálculos dos tempos de retenção e dos caudais, através das fórmulas 7, 8, 9 e 10 foi possível calcular a intensidade de radiação, a dosagem ( $D$ ) e a dosagem por volume ( $D_w$ ).

Dados:  
Total UV= 22 W  
 $h=63,5$  cm  
 $R=7$  cm

Área superficial cilindro= $2\pi Rh$  Equação 7

Intensidade= $\frac{\text{Total UV}}{\text{Área superficial}}$  Equação 8

$D=\text{Intensidade} \times \text{Tempo de retenção}$  Equação 9

$D_w = \frac{\text{Total UV}}{\text{Caudal}}$  Equação 10

Exemplo de cálculo para a experiência 6:

Como a área superficial e a potência da lâmpada são constantes ao longo das experiências, a Intensidade também é sempre igual em todos os ensaios.

Área superficial cilindro= $2\pi \times 7 \text{ cm} \times 63,5 \text{ cm} = 2792,9 \text{ cm}^2$

Intensidade= $\frac{22 \text{ W}}{2792,9 \text{ cm}^2} = 79 \times 10^{-4} \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$

Dosagem= $0,0079 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2} \times (2 \times 1600,0) \text{ s} = 25,28 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$

Dosagem/Volume =  $\frac{22 \text{ W}}{0,01 \text{ L/s}} = 2200,00 \text{ J/L}$