

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Mariana Cerqueira Queirós

Impacto do tratamento térmico no mosto de Vinho Verde

Tese de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho realizado sob a orientação do **Doutor Ricardo Nuno Correia Pereira** (Universidade do Minho) e do **Engenheiro Guilherme Paulo Dias de Castro Pereira** (Caves de São Bento)

Janeiro 2021

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-SemDerivações CC BY-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Muitos foram os que contribuíram para que esta dissertação fosse desenvolvida com o maior sucesso possível e, por isso, a todos eles presto o mais sincero agradecimento.

Dedico um especial agradecimento ao Doutor Ricardo Pereira, por todos os conhecimentos transmitidos, pela sua disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas e por toda a orientação do trabalho prático.

Ao Engenheiro Guilherme Pereira, gostaria de agradecer pela sua disponibilidade, por todo o conhecimento que me transmitiu e por me ter recebido na empresa Caves de São Bento.

Agradeço ao Doutor Diogo Queirós, que se mostrou igualmente disponível em me auxiliar nas várias etapas do meu trabalho e que me ajudou na melhor construção desta dissertação. Agradeço-lhe, também, por todo o apoio e por toda a paciência que teve, como irmão, ao longo destes anos.

Aos meus pais, agradeço por sempre me terem facultado todas as condições necessárias para que eu pudesse atingir todos os meus objetivos com o maior sucesso. Também lhes agradeço por todo o apoio, por sempre me terem transmitido confiança e orgulho e por me terem dado os melhores conselhos.

Ao Henrique, agradeço pela paciência, apoio, companheirismo, compreensão e força transmitida no decorrer da elaboração desta tese.

À Sara, agradeço por toda a motivação que me deu, por todas as consultas prestadas nos momentos menos bons e pelo apoio que me transmitiu, mesmo estando longe.

Por último, agradeço à Helena, à Joana e à Clara pela amizade, carinho, companheirismo e ajuda destes anos. Foram fundamentais para percorrer, com êxito, esta caminhada.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

RESUMO

Com este trabalho, pretendeu-se analisar o impacto da aplicação de uma tecnologia emergente, no processamento alimentar – aquecimento ôhmico, na atividade da enzima pectinase, utilizada no tratamento do mosto de Vinho Verde. Foi, igualmente, avaliado o efeito de três componentes do aquecimento ôhmico – temperatura, frequência e campo elétrico moderado, na atividade desta enzima.

O trabalho foi dividido em três principais etapas. A primeira consistiu em desenvolver uma matriz alimentar que simulasse o mosto de Vinho Verde, otimizando as condições ótimas de funcionamento da pectinase vínica – concentração de pectina, pH e temperatura. A segunda etapa consistiu na análise da influência das três componentes principais do aquecimento ôhmico – temperatura, frequência e campo elétrico – na pectinase, colocada na matriz alimentar preparada (pectina dissolvida em tampão citrato). Por fim, na última etapa, o melhor cenário encontrado na segunda fase (temperatura, frequência e campo elétrico) foi aplicado à pectinase adicionada no mosto de Vinho Verde.

Constatou-se que o aquecimento ôhmico influencia, significativamente, a atividade da pectinase vínica, em dois cenários possíveis – ativação e inativação enzimática - dependendo das condições de processamento elétrico aplicadas – temperatura entre 15 °C e 35 °C; frequência entre 50 Hz e 25 kHz e campo elétrico entre 0 V/cm e 14 V/cm.

À temperatura de 20 °C, frequência de 2 kHz e campo elétrico de 7 V/cm, o aquecimento ôhmico provoca um aumento de 43 % da atividade da pectinase, comparativamente com a atividade obtida quando a reação enzimática é promovida a 20 °C na ausência de campo elétrico. Quando esta condição foi aplicada na etapa de clarificação do mosto de Vinho Verde permitiu a hidrólise de mais 33 % de pectina em comparação o método de clarificação convencional, validando os resultados obtidos em matriz tampão.

O aquecimento ôhmico apresenta-se como uma tecnologia promissora no tratamento do mosto de Vinho Verde, nomeadamente no aumento de eficácia da hidrólise de pectina, e consequente clarificação do mosto a temperaturas relativamente baixas, entre 15 °C e 20 °C.

PALAVRAS-CHAVE

Mosto; Pectinase; Aquecimento Ôhmico; Ativação; Frequência Elétrica; Campo Elétrico

ABSTRACT

This work aimed to analyze the impact of the application of an emerging technology, in food processing – ohmic heating, in the activity of the enzyme pectinase, used in the treatment of the must of “Vinho Verde”. It was also evaluated the effect of three components of ohmic heating – temperature, frequency and moderate electric field, on the activity of this enzyme.

The work was divided into three main stages. The first consisted of developing a food matrix that simulated the must of “Vinho Verde”, optimizing the optimal conditions for the functioning of wine pectinase - pectin concentration, pH and temperature. The second stage consisted of analyzing the influence of the three main components of ohmic heating on pectinase – temperature, frequency and electric field, placed in the prepared food matrix. Finally, in the last stage, the best scenario found in the second phase (temperature, frequency and electric field) was applied to the pectinase added to the “Vinho Verde” must.

It was found that ohmic heating significantly influences the activity of wine pectinase, with two possible scenarios - enzymatic activation and inactivation - depending on the electrical processing conditions applied - temperature between 15 °C and 35 °C; frequency between 50 Hz and 25 kHz and electric field between 0 V / cm and 14 V / cm.

At a temperature of 20 °C, a frequency of 2 kHz and an electric field of 7 V/cm, ohmic heating causes a 43 % increase in pectinase activity, compared to the activity obtained when the enzymatic reaction is promoted at 20 °C in the absence of electric field. When this condition was applied in the clarification stage of the “Vinho Verde” must, it allowed the hydrolysis of an additional 33% of pectin compared to the conventional clarification method, validating the results obtained in a buffer matrix.

Ohmic heating presents itself as a promising technology in the treatment of “Vinho Verde” must, namely in increasing the efficiency of pectin hydrolysis, and consequent clarification of the must at relatively low temperatures, between 15 °C and 20 °C.

KEYWORDS

Must; Pectinase; Ohmic Heating; Activation; Electric Frequency; Electric Field

ÍNDICE

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros	I
Agradecimentos	II
Declaração de integridade.....	III
Resumo	IV
Abstract	V
Índice	VI
Índice de Figuras	VIII
Índice de Tabelas	XII
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos e Unidades.....	XIII
1. Introdução.....	1
1.1 Motivação e Objetivos.....	1
1.2 Organização da dissertação	2
2. Fundamentação Teórica	3
2.1 História dos vinhos.....	3
2.2 Designações oficiais.....	3
2.3 Regiões Vitivinícolas de Portugal.....	5
2.3.1 Região dos Vinhos Verdes ou Região do Minho	6
2.3.2 Processo de certificação dos Vinhos Verdes.....	8
2.4 Processo de Produção do Vinho Verde branco	12
2.4.1 Obtenção do mosto.....	13
2.4.2 Fermentação.....	15
2.4.3 Resíduos resultantes da produção de vinho	16
2.5 Métodos de conservação do mosto e do vinho	20
2.5.1 Método tradicional – SO ₂	20
2.5.2 Método alternativo – AO.....	24
3. Metodologias	39
3.1 Caracterização física e química do vinho.....	39
3.1.1 Determinação da percentagem de álcool	39
3.1.2 Determinação do pH	39
3.1.3 Determinação da acidez volátil.....	40

3.1.4	Determinação da acidez total.....	40
3.1.5	Determinação do SO ₂ livre.....	40
3.1.6	Determinação do SO ₂ total.....	41
3.2	Determinação da atividade enzimática.....	41
3.2.1	Método de DNS.....	41
3.2.2	Método da ciano acetamida.....	43
3.3	Ensaio enzimático pelo AC.....	44
3.4	Ensaio enzimático pelo AO.....	45
3.5	Quantificação de pectina no mosto de Vinho Verde.....	47
3.6	Análise estatística.....	48
4.	Resultados e Discussão.....	49
4.1	Otimização.....	49
4.1.1	Otimização do método de medição da atividade enzimática.....	49
4.1.2	Otimização do substrato e temperatura.....	50
4.2	Condutividade elétrica.....	52
4.3	Tratamentos pelo AO.....	53
4.3.1	Efeito da temperatura.....	54
4.3.2	Efeito da frequência.....	58
4.3.3	Efeito do campo elétrico.....	64
4.3.4	Validação do método de análise da atividade enzimática.....	69
4.4	Aplicação do AO no mosto de Vinho Verde.....	70
5.	Conclusões e Recomendações futuras.....	75
	Referências Bibliográficas.....	77
	Anexo A: Otimização do método de medição da atividade enzimática.....	85
	Anexo B: Otimização do substrato e temperatura.....	86
	Anexo C: Gráficos de obtenção da atividade enzimática – testes da temperatura.....	92
	Anexo D: Gráficos de obtenção da atividade enzimática – testes da frequência.....	97
	Anexo E: Gráficos de obtenção da atividade enzimática – testes do campo elétrico.....	103
	Anexo F: Curvas de calibração do método de DNS.....	108
	Anexo G: Curva de calibração do método da ciano acetamida.....	110
	Anexo H: Caracterização de vinhos.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Regiões Vitivinícolas de Portugal.....	5
Figura 2: Sub-Regiões da Região dos Vinhos Verdes.	6
Figura 3: Pictogramas para menção de substâncias ou produtos alergénicos presentes no vinho.	10
Figura 4: Selos de Garantia de vinhos com DO “Vinho Verde”.	11
Figura 5: Processo de vinificação do Vinho Verde Branco.	14
Figura 6: Gráfico referente à relação entre a percentagem de enxofre sob diversas formas mediante o pH do meio.	21
Figura 7: Componentes de uma instalação de AO.	25
Figura 8: Placa elisa – calibração de ácido galacturónico na gama de concentrações compreendida entre 0 g/L e 1 g/L pelo método de DNS.	42
Figura 9: Esquema da instalação experimental do AC.	44
Figura 10: Esquema da instalação experimental do AO.	45
Figura 11: (1) Mistura de mosto com solução de álcool acidificado; (2) Precipitação da pectina do mosto; (3) Pectina obtida após centrifugação; (4) Pectina seca.	48
Figura 12: Efeito da temperatura na atividade enzimática.	54
Figura 13: Relação entre a atividade enzimática da PEC vínica e a temperatura de 15 °C, 20 °C, 25°C, 30 °C e 35 °C pelo AC e AO. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.	56
Figura 14: Onda Sinusoidal.	58
Figura 15: Relação entre a atividade enzimática da PEC vínica e a frequência de 50 Hz, 100 Hz, 500 Hz, 2 kHz e 25 kHz, a 20 °C, pelos dois tipos de aquecimento - AC e AO. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.	60
Figura 16: Relação entre a atividade enzimática da PEC vínica e a frequência de 50 Hz, 100 Hz, 500 Hz, 2 kHz e 25 kHz, a 30 °C, pelos dois tipos de aquecimento - AC e AO. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.	63
Figura 17: Relação entre a atividade enzimática da PEC vínica e os campos elétricos de intensidade 0 V/cm (AC), 0,2 V/cm, 2 V/cm, 7 V/cm e 14 V/cm, conseguidos pela aplicação do AO, à temperatura de 20 °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.	66

Figura 18: Relação entre a atividade enzimática da PEC vínica e os campos elétricos de intensidade 0 V/cm (AC), 0,2 V/cm, 2 V/cm, 7 V/cm e 14 V/cm, conseguidos pela aplicação do AO, à temperatura de 30 °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.	67
Figura 19: Atividade enzimática da pectinase vínica - Método DNS e Método ciano acetamida.....	70
Figura 20: (1) Amostra de mosto não tratado; (2) Amostra de mosto tratado pelo AC; (3) Amostra de mosto tratado pelo AO.....	71
Figura 21: Pectina precipitada (1) no mosto não tratado, (2) no mosto tratado pelo AC e (3) no mosto tratado pelo AO.	72
Figura 22: Concentração de pectina precipitada na amostra de mosto não tratado e nas amostras de mosto com pectinase, tratado pelo aquecimento convencional e ôhmico. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.	73
Figura A 1: Atividade enzimática – Método DNS.....	85
Figura A 2: Atividade enzimática – Método Ciano acetamida.	85
Figura B 1: Atividade enzimática – Tampão Fosfato 0,1 mol/L, pH 7,5 e pectina na concentração de 5 g/L.....	86
Figura B 2: Atividade enzimática – Fase linear – Tampão Fosfato 0,1 mol/L, pH 7,5 e pectina na concentração de 5 g/L.	86
Figura B 3: Atividade enzimática – Tampão Citrato 0,1 mol/L pH 3,5 e pectina na concentração de 5 g/L.....	87
Figura B 4: Atividade enzimática – Fase linear – Tampão Citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 5 g/L.....	87
Figura B 5: Atividade enzimática – Tampão Citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 5 g/L.....	88
Figura B 6: Atividade enzimática – Tampão Citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 15 g/L.....	88
Figura B 7: Atividade enzimática – Tampão Citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 25 g/L.....	89
Figura B 8: Atividade enzimática - Tampão Citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 2,5 g/L a 27 °C.....	89

Figura B 9: Atividade enzimática - Tampão Citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 2,5 g/L a 12 °C.....	90
Figura B 10: Teste de reprodutibilidade da atividade enzimática - Tampão Citrato 0,05 mol/L pH 3,5 e pectina na concentração de 2,5 g/L a 27 °C.....	91
Figura B 11: Teste de reprodutibilidade da atividade enzimática - Tampão Citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 2,5 g/L a 12 °C.....	91
Figura C 1: Atividade enzimática pelo método do AC a 15 °C.....	92
Figura C 2: Atividade enzimática pelo método do AO a 15 °C.....	92
Figura C 3: Atividade enzimática pelo método do AC a 20 °C.....	93
Figura C 4: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C.....	93
Figura C 5: Atividade enzimática pelo método do AC a 25 °C.....	94
Figura C 6: Atividade enzimática pelo método do AO a 25 °C.....	94
Figura C 7: Atividade enzimática pelo método do AC a 30 °C.....	95
Figura C 8: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C.....	95
Figura C 9: Atividade enzimática pelo método do AC a 35 °C.....	96
Figura C 10: Atividade enzimática pelo método do AO a 35 °C.....	96
Figura D 1: Atividade enzimática pelo método do AC a 20 °C.....	97
Figura D 2: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 7 V/cm e 50 Hz.....	97
Figura D 3: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 7 V/cm e 100 Hz.....	98
Figura D 4: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 7 V/cm e 500 Hz.....	98
Figura D 5: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 7 V/cm e 2000 Hz.....	99
Figura D 6: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 7 V/cm e 25000 Hz.....	99
Figura D 7: Atividade enzimática pelo método do AC a 30 °C.....	100
Figura D 8: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 7 V/cm e 50 Hz.....	100
Figura D 9: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 7 V/cm e 100 Hz.....	101
Figura D 10: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 7 V/cm e 500 Hz.....	101
Figura D 11: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 7 V/cm e 2000 Hz.....	102
Figura D 12: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 7 V/cm e 25000 Hz.....	102
Figura E 1: Atividade enzimática pelo método do AC a 20 °C.....	103
Figura E 2: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 2000 Hz e 0,2 V/cm.....	103

Figura E 3: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 2000 Hz e 2 V/cm.	104
Figura E 4: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 2000 Hz e 7 V/cm.	104
Figura E 5: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 2000 Hz e 14 V/cm.....	105
Figura E 6: Atividade enzimática pelo método do AC a 30 °C.	105
Figura E 7: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 100 Hz e 0,2 V/cm.....	106
Figura E 8: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 100 Hz e 2 V/cm.	106
Figura E 9: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 100 Hz e 7 V/cm.	107
Figura E 10: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 100 Hz e 14 V/cm.....	107
Figura F 1: Curva de calibração do DNS de Janeiro - Março.....	108
Figura F 2: Curva de calibração do DNS de Maio - Junho.....	108
Figura F 3: Curva de calibração do DNS de Agosto.....	109
Figura F 4: Curva de calibração do DNS de Setembro - Outubro.	109
Figura G 1: Curva de calibração do método da ciano acetamida de Janeiro - Março.....	110
Figura G 2: Curva de calibração do método da ciano acetamida de Outubro.....	110

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais parâmetros do AO.....	26
Tabela 2: Efeito da temperatura e dos campos elétricos moderados do AO nos microrganismos, em relação ao AC	30
Tabela 3: Efeito da temperatura, frequência e dos campos elétricos moderados do AO nas enzimas, em relação ao AC	34
Tabela 4: Condições de temperatura, frequência e campo elétrico testadas no AO	46
Tabela 5: Atividade enzimática da PEC vínica à temperatura de 15 °C, 20 °C, 25°C, 30 °C e 35 °C, obtida pelos dois tipos de aquecimento – AO e AC.....	57
Tabela 6: Atividade enzimática da PEC vínica em função da frequência de 50 Hz, 100 Hz, 500 Hz, 2 kHz e 25 kHz, a 20 °C, pelos dois tipos de aquecimento - AC e AO.....	62
Tabela 7: Atividade enzimática da PEC vínica em função da frequência de 50 Hz, 100 Hz, 500 Hz, 2 kHz e 25 kHz, a 30 °C, pelos dois tipos de aquecimento - AC e AO.....	64
Tabela 8: Atividade enzimática da PEC vínica a 20 °C e 2 kHz e a 30 °C e 100 Hz sob aplicação de campos elétricos de intensidade 0,2 V/cm, 2 V/cm, 7 V/cm e 14 V/cm.....	69
Tabela 9: Quantificação da pectina na amostra de mosto não tratado e nas amostras de mosto com pectinase, tratado pelo aquecimento convencional e óhmico.....	73
Tabela H 1: Caracterização de um vinho branco frutado.....	112
Tabela H 2: Caracterização de um vinho branco maduro.....	113
Tabela H 3: Caracterização de um vinho rosé maduro	114

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS E UNIDADES

DNS	3,5-Dinitrosalicílico
Abs	Absorbância
AF	Acidez Fixa
AT	Acidez Total
AV	Acidez Volátil
A	Ampere – unidade da corrente elétrica
A	Amplitude
AC	Aquecimento convencional
AO	Aquecimento óhmico
U	Atividade enzimática
E	Campo elétrico
CFC's	Clorofluorcarbonetos
CVRV	Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes
CE	Comissão Europeia
λ	Comprimento de onda
CEE	Comunidade Económica Europeia
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCP	Declaração de Colheita e Produção
DO	Denominação de Origem
DOC	Denominação de Origem Controlada
DOP	Denominação de Origem Protegida
CO ₂	Dióxido de Carbono
SO ₂	Dióxido de enxofre
FDA	Food and Drug Administration
ALP	Fosfatase alcalina
F	Frequência
GRAS	Generally Recognized as Safe
g	Gramma
Hz	Hertz
SF ₆	Hexafluoreto de enxofre

HFC 's	Hidrofluorcarbonetos
HSO ₃ '	lão bissulfito
SO ₃ ²⁻	lão sulfito
IG	Indicação Geográfica
IGP	Indicação Geográfica Protegida
IVV	Instituto do Vinho e das Vinhas
OIV	International Organisation of Vine and Wine
kHz	Kilohertz
LOX	Lipoxigenase
L	Litro
CH ₄	Metano
m	Metro
μmol	Micromol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
Ω	Ohms – Unidade de resistência elétrica
N ₂ O	Óxido nitroso
PAL	Pectatoliase
PEC	Pectinase
PE	Pectinesterase
PL	Pectinliase
PME	Pectinmetilesterase
PFC 's	Perfluorocarbonetos
T	Período
POD	Peroxidase
PPO	Polifenoloxidase
PG	Poligalacturonase
s	Segundo
SI	Sistema Internacional
β-GAL	β-galactosidase

T	Temperatura
VBNC	Viable But Non Culturable
V	Volts – Unidade de tensão elétrica
V	Volume

1. INTRODUÇÃO

1.1 Motivação e Objetivos

Portugal é um país vitivinícola de referência, caracterizado pelo prestígio dos seus vinhos e pelo carácter único que apresentam devido às influências de diversas civilizações (IVV,s.d.).

O Vinho Verde é um produto de destaque nos mercados nacionais e com um relevo cada vez maior noutros países, pois é único no mundo. O Vinho Verde apresenta diversas características que o definem e diferenciam: a frescura vibrante, a elegância e leveza, a expressão aromática e gustativa, com destaque para as suas notas frutadas e florais (Vinho Verde,s.d.).

A produção de Vinho Verde é complexa e envolve a viticultura – área multidisciplinar dotada do conhecimento científico essencial para que seja possível estabelecer, num determinado solo, uma vinha que produza as uvas em quantidade, qualidade e estado sanitário necessários à produção de um determinado tipo de vinho; e a vinificação – engloba um conjunto de operações que permitem a transformação da uva em vinho. A vinificação engloba as operações de produção, conservação, acondicionamento e comercialização de vinhos (Sogrape,s.d.).

O vinho é uma bebida produzida a partir de uvas e, por esta razão, a atividade de produção de vinho é sazonal, pois ocorre quando as uvas estão num estado de maturação adequado. Enquanto que a produção de vinho é sazonal, o comércio de vinho é anual. Este desequilíbrio faz com que a conservação/estabilização seja uma etapa fundamental no processo de vinificação.

Convencionalmente, a conservação/estabilização é conseguida pela adição do dióxido de enxofre (SO₂) (no mosto e/ou no vinho), que, devido às suas propriedades antissépticas, antioxidantes e antioxidásicas, protege o vinho contra oxidações e inibe a atividade de microrganismos e de enzimas, que podem provocar efeitos indesejáveis na qualidade do vinho (Oliveira, 2019). O problema do uso do SO₂ como conservante reside no facto de este componente ser alergénico e, por isso, poder causar problemas ao consumidor – alergias, dores de cabeça, irritação gástrica e náuseas. Além disso, se for necessário retirar o SO₂ do mosto, para que este possa ser fermentado, o processo de dessulfuração – mosto com SO₂ aquecido a 120 °C numa coluna de destilação fracionada durante 10 min – poderá afetar a qualidade organolética do produto final (Regulamento (CE) N.º 606/2009; Divol et al. 2012; Tecnilab,s.d).

O aquecimento óhmico (AO), devido à sua ação termoelétrica, surge como uma possível alternativa à estabilização microbiológica do mosto de Vinho Verde, assim como do próprio vinho,

reduzindo o uso de produtos químicos como o SO_2 . Durante o AO, a conjugação das variáveis elétricas com temperaturas moderadas poderá exercer uma ação letal em microrganismos e enzimas. Para além disso, o AO também poderá, em alguns casos, potenciar a atividade enzimática de algumas enzimas.

O objetivo deste trabalho centra-se em avaliar o impacto do AO na atividade enzimática da pectinase (PEC) – enzima importante na etapa de clarificação do vinho devido à sua capacidade de hidrolisar a pectina, a fim de se determinar a influência dos parâmetros elétricos na atividade enzimática e avaliar a possível utilidade desta tecnologia no processo de produção do Vinho Verde. Numa fase inicial o AO será aplicado à enzima PEC numa matriz de tampão e pectina. Nesta fase serão estudados três parâmetros do AO – temperatura (entre 15 °C e 35 °C), frequência (entre 50 Hz e 25 kHz) e campo elétrico (entre 0 V/cm e 14 V/cm), com o objetivo de eleger a melhor condição (conjugação dos três parâmetros). Numa fase posterior do trabalho, a condição ótima obtida na primeira fase será aplicada à enzima PEC colocada no mosto de Vinho Verde, com a finalidade de perceber se o AO será benéfico na fase de clarificação do mosto.

1.2 Organização da dissertação

O documento está dividido em cinco capítulos. O primeiro capítulo corresponde à apresentação do trabalho e da sua importância. No segundo capítulo é feita uma contextualização teórica dos principais temas desta dissertação: Vinho Verde em Portugal, processo de produção de Vinho Verde e técnicas de conservação do mosto e do Vinho Verde – SO_2 (técnica atual) e AO (técnica inovadora). No caso deste trabalho, o efeito da tecnologia de AO será analisada sob a atividade enzimática da enzima PEC. Fato importante na etapa de clarificação do mosto de Vinho Verde, uma vez que o AO, para além de apresentar potencial inativador de enzimas, parece ter a capacidade de potenciar atividade de outras. O terceiro capítulo diz respeito à descrição aos materiais e metodologias de análise. No capítulo quatro são apresentados os principais resultados obtidos e respetiva análise e discussão. O capítulo cinco reúne as principais conclusões obtidas com este trabalho e recomendações para possíveis futuras investigações.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 História dos vinhos

O vinho remonta a diversos períodos históricos e está repleto de simbologia, sendo a sua origem concreta difícil de precisar (IVV,s.d.).

A vinha terá sido cultivada pela primeira vez na Península Ibérica, mais concretamente nos vales do Tejo e Sado, por volta do ano 2000 a.C, pelos Tartéssios. Até ao século IV a.C várias foram as civilizações que se foram instalando na Península Ibérica, como os Fenícios, Gregos, Celtas e Celtiberos, que desenvolveram a vitivinicultura e introduziram algumas variedades de videira. A entrada dos Romanos na Península Ibérica, a partir de 194 a.C, e a expansão do Cristianismo nos séculos VI e VII, contribuíram para a difusão do vinho e para o desenvolvimento de técnicas e aperfeiçoamento de outras, passando o vinho a ter uma enorme importância (IVV,s.d.).

Portugal foi fundado em 1143 e o vinho passou a fazer parte da alimentação da sua população e a ter grande significado nos rendimentos dos senhores feudais. Com a expansão dos descobrimentos, o vinho era um dos produtos transportados pelas naus, permitindo a sua disseminação pelo mundo. Também graças aos descobrimentos, Lisboa torna-se o maior centro de consumo e de distribuição de vinhos, tendo o volume de exportações sofrido um incremento substancial em 1703, com a assinatura do *Tratado Comercial de Methuen* com a Inglaterra (IVV,s.d.).

Portugal é uma região vitivinícola de referência caracterizada pelo prestígio dos seus vinhos e pelo carácter único que apresentam devido às influências de diversas civilizações (IVV,s.d.).

2.2 Designações oficiais

Na área dos vinhos são várias as denominações que foram definidas a nível Europeu de modo a estabelecer uma organização comum dos mercados vitivinícolas e a permitir uma resposta mais flexível às questões que se coloquem dentro do setor vitivinícola.

De acordo com o Regulamento (CE) nº 491/2009 do conselho de 25 de maio de 2009, foram definidos alguns termos, a saber:

- **Uvas frescas** – “Os frutos da videira utilizados para a vinificação, maduros ou ligeiramente passados, suscetíveis de serem esmagados ou espremidos com meios normais de adegas e de originarem espontaneamente uma fermentação alcoólica.”;

- **Mosto de uvas** – “O produto líquido obtido naturalmente ou por processos físicos a partir de uvas frescas.”;
- **Vinho** – “Produto obtido exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mostos de uvas não podendo possuir um título alcoométrico superior a 1 %.”.

O Regulamento (CE) n° 491/2009 do conselho de 25 de maio de 2009 e o Decreto-lei n° 212/2004 de 23 de agosto de 2004 permitem definir algumas designações oficiais relacionadas com a organização institucional do setor vitivinícola, a saber:

- **Denominação de Origem – DO** – “Designação aplicável a produtos cuja originalidade e individualidade esteja relacionada de forma indissociável com uma região, com um local ou, ainda, com uma denominação tradicional, que permita identificar o produto vitivinícola.”;
- **Denominação de Origem Protegida – DOP** – “Esta denominação é usada para designar os vinhos que tenham Denominação de Origem, aos quais é conferida a proteção nos termos estabelecidos na regulamentação e que integram um registo comunitário único.”;
- **Denominação de Origem Controlada – DOC** – “Esta Denominação é uma menção tradicional específica que pode ser usada em Portugal na rotulagem dos produtos que tenham Denominação de Origem. Ao usar esta menção a utilização de DOP não é necessária.”;
- **Indicação Geográfica – IG** – “Esta designação é aplicável a produtos com direito a indicação geográfica produzidos numa região específica (adotando o nome dessa região), sendo que cerca de 85 % das uvas usadas têm que ser provenientes dessa região e de castas previamente estabelecidas.”;
- **Indicação Geográfica Protegida - IGP**– “Designação adotada a fim de designar os vinhos com Indicação Geográfica aos quais é conferida proteção nos termos estabelecidos na regulamentação e que integram um registo comunitário único.”.

A *International Organisation of Vine and Wine* (OIV) é uma organização intergovernamental de natureza científica e técnica, de reconhecida competência pelos seus trabalhos relativos à vinha, ao vinho, às bebidas à base de vinho, às uvas de mesa, às uvas passas e a outros produtos com base na vinha. Esta organização foi estabelecida em 2001 e é composta por 47 Estados-Membros. A OIV tem

como principal missão harmonizar as práticas enológicas e standards entre as várias nações, mantendo os interesses dos consumidores em primeiro lugar (OIV,s.d.).

2.3 Regiões Vitivinícolas de Portugal

Segundo o Instituto do Vinho e da Vinha, Portugal está dividido em 14 regiões Vitivinícolas, conforme se encontra na Figura 1 (IVV,s.d.).

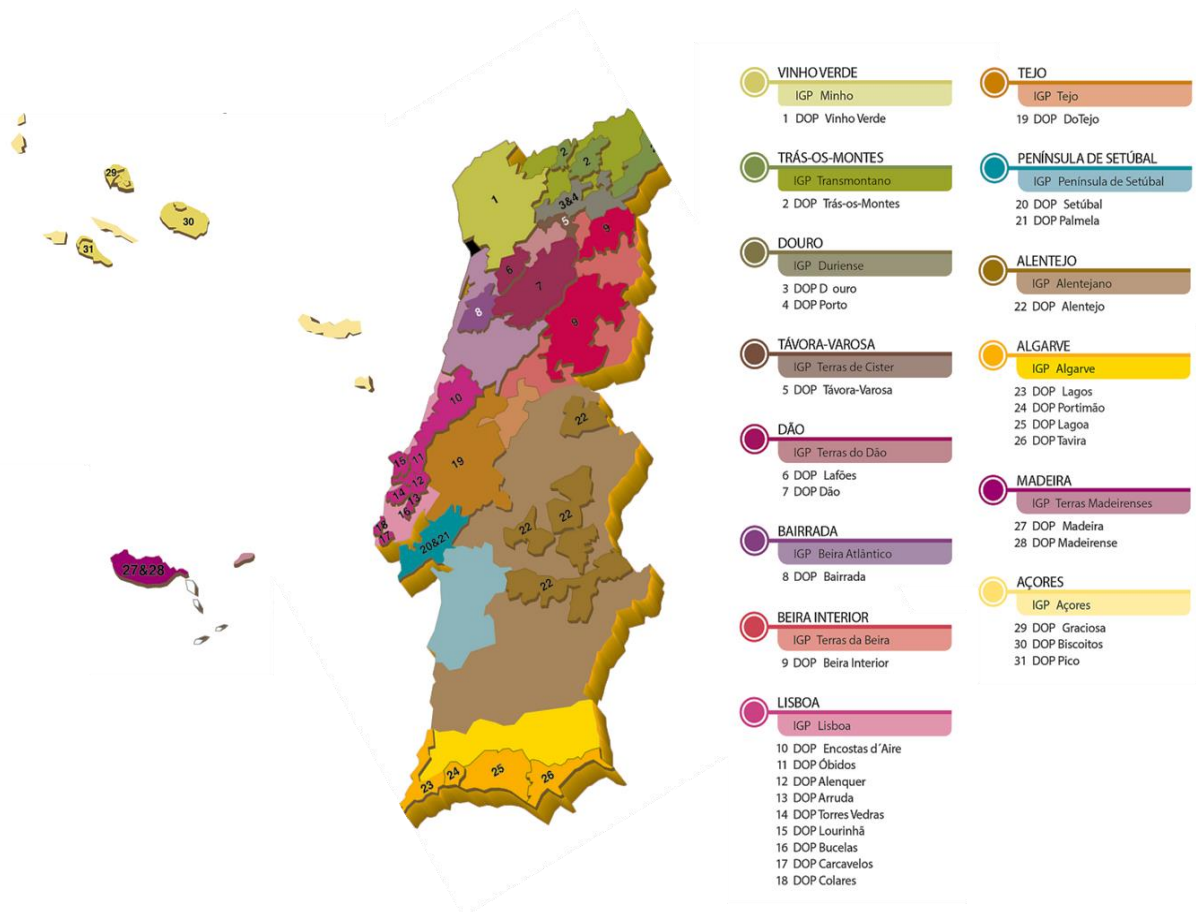


Figura 1: Regiões Vitivinícolas de Portugal (adaptado de IVV,s.d.).

Na Figura 1, para além de estarem discriminadas as 14 regiões Vitivinícolas de Portugal, são também apresentadas as Denominações de Origem Protegida (DOP) existentes em cada região e as Indicações Geográficas Protegidas (IGP) (IVV,s.d.).

Para este trabalho, será dado destaque à região do Minho, conhecida pela região dos Vinhos Verdes.

2.3.1 Região dos Vinhos Verdes ou Região do Minho

A Região dos Vinhos Verdes foi demarcada, oficialmente, em 18 de setembro de 1908, e é a maior região vitícola de Portugal e uma das maiores da Europa. A Região dos Vinhos Verdes, também conhecida por Região do Minho, situa-se no noroeste de Portugal, coincidindo com a região não vitícola tradicionalmente designada como Entre-Douro-e-Minho. Esta Região é limitada a norte pelo Rio Minho, que faz fronteira com Espanha, pelo Oceano Atlântico a oeste, a Sul pelo Rio Douro e Serras e, por fim, a Este é também limitada por Serras, sendo a maior a Serra da Peneda, Gerês (Vinho Verde,s.d.; Infovini,s.d.).

Segundo o artigo 2 da Portaria nº 152/2015 de 26 de maio do Regulamento de Produção e comércio da DO “Vinho Verde”, a Região da Denominação de Origem Vinhos Verdes abrange todos os municípios dos distritos de Braga e de Viana do Castelo e alguns municípios dos distritos de Aveiro, Porto, Vila Real e de Viseu (CVRVW, 2015).

A Região dos Vinhos Verdes divide-se em 9 Sub-Regiões, como é visível na Figura 2:

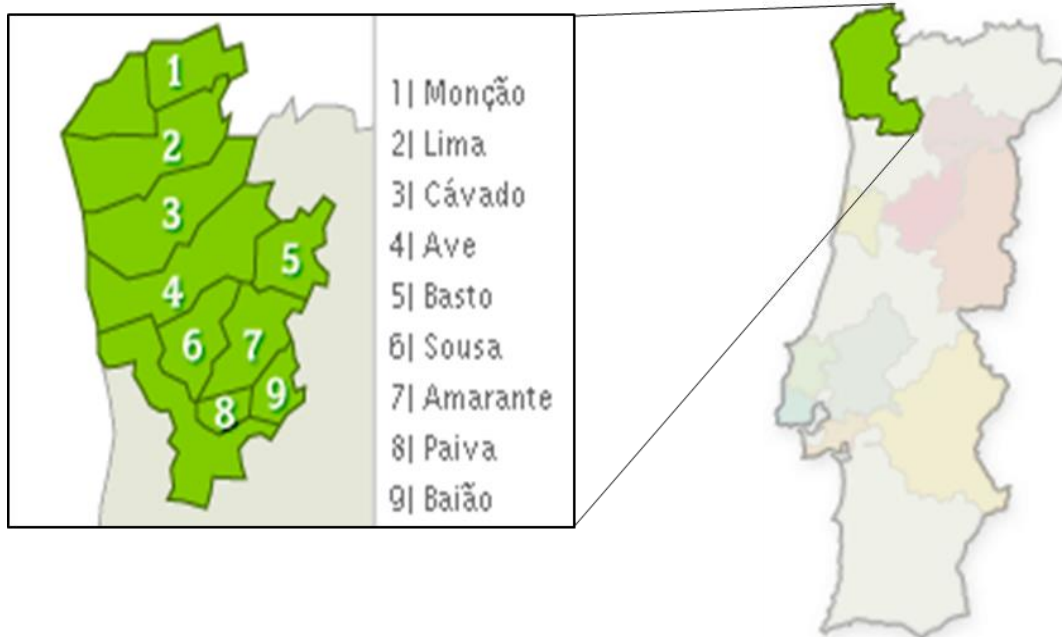


Figura 2: Sub-Regiões da Região dos Vinhos Verdes (adaptado de Infovini,s.d.).

Na Figura 2 está delimitada a Região dos Vinhos Verdes que contempla 9 Sub-Regiões a saber: Monção e Melgaço, Lima, Cávado, Ave, Basto, Sousa, Amarante, Paiva e Baião (CVRVW, 2015).

A Denominação de Origem “Vinho Verde” designa os produtos vitivinícolas cuja originalidade, individualidade e qualidade resultam das características da Região Demarcada dos Vinhos Verdes e cuja

respetiva vinificação e produção se processam nesta Região (Vinho Verde,s.d.; CVRVV, 2015). Para o reconhecimento da Denominação de Origem “Vinho Verde” é necessário um controlo rigoroso do processo de produção em todas as suas etapas, de modo a que os requisitos estabelecidos na legislação aplicável sejam cumpridos (Vinho Verde,s.d.; CVRVV, 2015). A garantia da genuinidade e qualidade dos produtos com DO “Vinho Verde” é atribuída pelo Selo de Garantia (Figura 3), que certifica o Vinho Verde desde 1959 (Vinho Verde,s.d.; CVRVV, 2015). A DO “Vinho Verde” é usada para identificar produtos que se encontram numa das diferentes categorias a seguir explicitadas (Vinho Verde,s.d.; CVRVV, 2015):

- Vinho Verde – vinho branco, tinto ou rosado;
- Espumante de qualidade de Vinho Verde - vinho espumante de qualidade branco, tinto ou rosado;
- Espumante de Vinho Verde – vinho espumante branco, tinto ou rosado;
- Aguardente vínica de Vinho Verde – aguardente vínica;
- Aguardente bagaceira de Vinho Verde – aguardente bagaceira;
- Vinagre de Vinho Verde – vinagre de vinho branco, tinto ou rosado.

Nesta região, a área de produção da DO “Vinho Verde” coincide com a área de produção da IG “Minho” e, de forma análoga, à DO “Vinho Verde”. Os vinhos que apresentem IG “Minho” estão sujeitos a um controlo de todas as etapas do processo de produção, tendo, por isso, um processo de certificação de elevado rigor técnico (Vinho Verde,s.d.; CVRVV, 2015). A garantia da autenticidade e qualidade dos produtos com IG “Minho” é atribuída pelo Selo de Garantia Minho (Vinho Verde,s.d.; CVRVV, 2015).

O vinho Regional do Minho autoriza várias castas, a saber (Vinho Verde,s.d.; CVRVV, 2015):

- 33 Castas Brancas, como por exemplo Alvarinho, Loureiro e Azal;
- 2 Castas Rosadas, a saber, Pinot Gris e Gewürztraminer;
- 32 Castas Tintas, como por exemplo Espadeiro e Castelão.

Esta Região é semelhante a um anfiteatro que se eleva, gradualmente, desde o mar até ao interior, o que faz com que toda esta região esteja exposta à influência do Oceano Atlântico (Vinho Verde,s.d.; Infovini,s.d.; Climaco, 2012 & IW,s.d.). Os solos desta Região são, na maioria, graníticos e pouco profundos, com baixo nível de fósforo e de potássio e com elevada acidez natural (Vinho Verde,s.d.; Infovini,s.d.; Climaco, 2012 & IW,s.d.). O clima é condicionado pelas características do relevo e da rede

fluvial da Região. A precipitação anual é bastante elevada (entre 1200 mm e 14000 mm) e irregular, porém a maior intensidade corresponde às estações de Outono e de Inverno. A oscilação da temperatura evolui com o nível de precipitação, ou seja, as temperaturas mais elevadas correspondem aos períodos com menores precipitações, e as temperaturas mais baixas aos períodos em que a precipitação é maior. Porém, como a amplitude térmica é reduzida, o clima é considerado ameno. Por fim, esta região também é afetada por ventos marítimos criando forte nevoeiros de humidade intensa (Vinho Verde, s.d.; Infovini, s.d.; Climaco, 2012 & IW, s.d.). As vinhas desta região estão, igualmente, sujeitas a geadas e a granizos a partir de meados de maio (Vinho Verde, s.d.; Infovini, s.d.; Climaco, 2012 & IW, s.d.). O clima característico desta região é favorável ao aparecimento de várias doenças, como é o caso do mildio - provocado pelo oomicete *Plasmopara viticola*, que ataca todos os órgãos verdes da videira provocando necroses e morte, e da podridão cinzenta - provocada pelo fungo polífago *Botrytis cinerea*, que hiberna na videira como esclerato ou micélio até à primavera, onde depois germina dando origem a frutificações cinzentas (Vinho Verde, s.d.; Climaco, 2012 & IW, s.d.).

2.3.2 Processo de certificação dos Vinhos Verdes

O primeiro passo no processo de certificação é a inscrição na Entidade Certificadora. Todos os produtores e comerciantes de produtos vitivinícolas com DO “Vinho Verde” devem proceder à sua inscrição no Instituto da Vinha e do Vinho, como operadores do setor vitivinícola, seguida de outra inscrição no Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV). Os produtores devem também proceder à inscrição das suas vinhas na CVRVV, assim como as respetivas instalações. As Instalações para além de inscritas na CVRVV são obrigadas a estar localizadas dentro da área geográfica delimitada como sendo a Região dos Vinhos Verdes e, devem ser exclusivas para os produtos com DO, com a exceção das instalações de armazenagem e pré-embalagem (IVV, s.d.; CVRVV, 2019).

A segunda etapa do processo de certificação consiste no preenchimento da Declaração de Colheita e Produção (DCP). O preenchimento desta declaração é obrigatório, sendo divulgada a produção de uvas, mosto e vinho obtidos anualmente, o que permite, aos produtores, comercializar a sua produção (IVV, s.d.; CVRVV 2019 & Regulamento (CE) n° 479/2008).

Os vinhos com DO, segundo o Regulamento de Produção e Comércio da DO “Vinho Verde” de 13 de junho de 2015, só podem ser colocados em circulação e comercializados se (CVRVV, 2015; CVRVV, 2019):

- estiverem acompanhados da respetiva documentação oficial, onde conste essa aptidão e onde conste a sua DO;
- forem cumpridas todas as exigências impostas pela legislação em vigor ou regulamento interno da entidade certificadora;
- nos respetivos recipientes, à saída das instalações de produção, figurar a denominação do produto.

Segundo o mesmo Regulamento, os produtos com direito à DO “Vinho Verde” só podem ser comercializados em vasilhame de vidro, equipado com um mecanismo de fecho irrecuperável, rotulado e com a certificação do produto comprovada através do selo de garantia (Vinho Verde, s.d.; CVRVV, 2015 & CVRVV, 2019).

Relativamente à rotulagem, existem menções obrigatórias e menções facultativas. As menções obrigatórias devem ser coladas no mesmo campo visual do vasilhame de vidro, de maneira a que possam ser lidas simultaneamente, sem a necessidade de rodar o recipiente. Dentro desta categoria devem ser apresentadas as seguintes indicações (CVRVV, 2019):

- “Vinho Verde” – menção que deve apresentar maior destaque no rótulo;
- “Denominação de Origem Controlada” (DOC) – deve ser colocada logo a seguir à menção de Vinho Verde, mas com menor destaque;
- Volume Nominal – expresso em litro, centilitros ou então em mililitro;
- Título Alcoométrico Volúmico adquirido – indicação feita por unidade ou meia unidade de percentagem de volume, sendo expresso em “% vol”;
- Lote – esta indicação deverá ser precedida da letra L, para facilitar a sua identificação para efeitos de rastreabilidade;
- Identificação do Engarrafador – através da indicação do nome ou da denominação social, município ou freguesia do engarrafador, ou do local do engarrafamento;
- Marca – a marca a ser identificada deve estar registada, devidamente, nos Termos do Código da Propriedade Industrial;
- “Sujeito a Depósito” – menção obrigatória nos vinhos que, após engarrafamento e certificação, sejam suscetíveis de apresentar depósito;

- “Palhete” ou “Palheto” – esta indicação é obrigatória nos vinhos que sejam obtidos através da curtimenta conjunta de uvas tintas e brancas (não podendo estas ultrapassar 15 % do total de uvas usadas);
- “Vindima Tardia” ou “Colheita Tardia” ou “Late Harvest” – menção necessária para vinhos que sejam produzidos a partir de uvas com sobre maturação;
- Ingredientes ou Auxiliares Tecnológicos – menções relativas às substâncias ou produtos que estejam presentes no produto acabado e sejam suscetíveis de provocar alergias ou intolerâncias. Estas menções podem ser acompanhadas por pictogramas como por exemplo:



Figura 3: Pictogramas para menção de substâncias ou produtos alergénicos presentes no vinho (adaptado de CVRVV, 2019).

- Indicação da Proveniência – menção referente à proveniência do vinho, como por exemplo “vinho de Portugal”.

No rótulo podem também ser apresentadas outras menções da categoria Menções Facultativas, como é o caso das seguintes indicações (CVRVV, 2019):

- Ano da colheita – apenas admissível se o vinho foi preparado com pelo menos 85 % das uvas colhidas no ano em questão;
- “Quinta”, “Casa”, “Paço”, “Palácio”, “Solar” – menções usadas para identificar uma exploração vitícola, desde que o vinho resulte unicamente das uvas dessa exploração;
- “Seco”, “Meio Seco” ou “Adamado”, “Meio Doce”, “Doce” – menções usadas com base no teor de açúcares, expresso em frutose e glucose, presente no vinho.

A Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes tem como funções o controlo da produção, do comércio e da certificação dos vinhos e produtos vitivinícolas com direito à DO “Vinho Verde”. Para efetuar tal controlo, a CVRVV deve fazer uma verificação das características das vinhas e das uvas, deve fazer inspeções a todas as instalações relacionadas com todo o processo produtivo, desde a receção das vindimas à distribuição do vinho engarrafado ou à venda a retalho dos produtos e deve recolher amostragens em várias fases do processo de forma a proceder à realização de análises. Estas análises devem ser feitas em laboratórios da CVRVV, que são acreditados. Nestes laboratórios devem ser determinados alguns parâmetros, como por exemplo (CVRVV, 2015; CVRVV, 2019; Infovini,s.d.):

- Título alcoométrico total e adquirido;
- Teor de açúcares totais expresso em frutose e glucose;
- Acidez total e volátil;
- SO₂ total.

Além destas análises deve ser feito um exame organolético do aroma, sabor e aspeto visual, realizado pela Câmara de Provadores (CVRVV, 2015; CVRVV, 2019 & IVV,s.d.).

Quando é garantido o cumprimento de todos os requisitos anteriormente referidos a CVRVV atribui o selo de garantia. Na Figura 4 encontram-se alguns exemplos de selos de garantia atribuídos pela CVRVV (Vinho Verde,s.d.; CVRVVV, 2015; CVRVVV, 2019).



Figura 4: Selos de Garantia de vinhos com DO “Vinho Verde” (adaptado de Vinho Verde,s.d.).

O Selo de Garantia surgiu da necessidade de proteger a autenticidade, origem e qualidade dos produtos vitivinícolas com DO “Vinho Verde”. Assim, o Selo de Garantia garante o controlo rigoroso

realizado em todas as etapas do processo produtivo do vinho. Cada Selo de Garantia é único apresentando uma codificação específica e individual que permite a rastreabilidade através do site da CVRVV (Vinho Verde,s.d.; CVRVV, 2019).

2.4 Processo de Produção do Vinho Verde branco

O processo de produção de um Vinho Verde Branco de boa qualidade e com a reconhecida Denominação de Origem “Vinho Verde” vai desde a fase de viticultura até à fase de comercialização do vinho (Vinho Verde,s.d.; Oliveira, 2019).

O processo de produção inicia-se com a escolha do terreno onde serão plantadas as vinhas. Face às características naturais do solo, pode ser necessário proceder a algumas correções de forma a melhorar a qualidade do mesmo. A primeira ação passa pela adubação de fundo de forma a proporcionar uma boa reserva de nutrientes no solo antes da plantação das vinhas. De seguida, pode ser necessário proceder a uma correção orgânica através da incorporação de estrumes. Os solos devem apresentar um pH entre 5,6 e 6,5 e, portanto, se as análises realizadas ao solo apresentarem valores diferentes é necessário corrigir o pH do solo. Por fim, pode ser necessária uma adubação fosfo-potássica, uma vez que o fósforo e o potássio são dois nutrientes essenciais no cultivo da vinha, devendo existir em quantidade suficiente em profundidade (Vinho Verde,s.d.; Oliveira, 2019).

As castas escolhidas para serem plantadas devem ser as indicadas para a respetiva sub-região, de forma a poderem contemplar as designações da sub-região e a denominação de origem de “Vinho Verde” (Vinho Verde,s.d; CVRVV, 2015). Face à natureza do solo e às características da casta pode ser necessário escolher um porta-enxerto e proceder à enxertia. Neste caso, a vinha, já enxertada, deve ser plantada na época de repouso vegetativo, que corresponde aos meses de janeiro a março e no sentido Norte-Sul, para possibilitar o melhor aproveitamento da radiação solar. A escolha do sistema de condução da vinha (disposição espacial que se dá à videira) é muito importante, pois a forma de condução interfere diretamente no comportamento fisiológico da videira, condicionando o microclima luminoso e térmico ao nível das folhas e dos cachos, o que afeta a qualidade da vindima (Vinho Verde,s.d.; Oliveira, 2019).

Ao longo do crescimento da vinha é necessário conservar as características do solo, regar, realizar as podas (que possibilitam um equilíbrio entre a quantidade e qualidade das uvas da próxima vindima), fazer intervenções em verde (que proporcionam melhores condições de crescimento e maturação dos cachos) e aplicar tratamentos fitossanitários para combater pragas (as condições

ambientais características das diversas regiões proporcionam o desenvolvimento de diversas doenças e pragas) (Vinho Verde,s.d.; Oliveira, 2019).

As adegas e todo o material utilizado na produção do vinho devem estar devidamente higienizados. Além disso, as adegas devem apresentar algumas características específicas de forma a possibilitar a criação de um ambiente propício à produção de vinho de boa qualidade, como serem bem arejadas e secas e apresentarem temperaturas baixas (Vinho Verde,s.d.; Oliveira, 2019).

Um aspeto extremamente importante para a obtenção de um vinho com boa qualidade é a determinação do momento ideal da vindima, bem como o processo de vindima. Ao longo do tempo, os bagos das uvas vão sofrendo alterações a nível do tamanho, cor e composição. Para determinar a data da vindima podem ser usados métodos simples e empíricos, mas subjetivos – observação da cor da película dos bagos, facilidade com que os bagos se desprendem do cacho, aspeto pegajoso que o mosto provoca nos dedos, sensação de doçura que os bagos deixam na boca, ou métodos mais rigorosos – avaliar o aumento da concentração de açúcares, avaliar a diminuição da acidez total e determinar o teor em álcool provável (Vinho Verde,s.d.; Oliveira, 2019). Um dos métodos para avaliar a concentração de açúcares pode ser o HPLC (High -Performance Liquid Chromatography / Cromatografia líquida de alta eficiência), uma técnica analítica que permite separar, identificar e quantificar os componentes presentes numa amostra. A acidez total pode ser determinada através de uma titulação com hidróxido de sódio na presença de azul de bromotimol (indicador de pH – apresenta cor amarela em solução ácida, cor azul em solução básica e cor verde em solução neutra). O teor de álcool provável está relacionado com teor de açúcares redutores existente e, por isso, o método mais usual para determinar o teor alcoólico provável é através da refratometria, que relaciona o valor de açúcares com o grau alcoólico provável através de duas escalas (gama de grau Brix (°B)) e gama de percentagem de álcool provável) que existem no refratómetro específico para vinhos (Regulamento (CE) n° 2676/90).

2.4.1 Obtenção do mosto

Escolhido o momento ideal da vindima, faz-se a colheita das uvas. Só devem ser colhidas as que estejam em bom estado de maturação, desprezando-se as uvas podres e as que apresentem sinais de doença. Neste processo a rutura da película dos bagos durante a colheita também deve ser evitada, uma vez que é fundamental que os bagos estejam intactos de forma e evitar perdas, infeções e alteração da composição aromática dos bagos. A vindima pode ser manual ou mecânica, dependendo da forma como as vinhas foram implantadas no terreno (Vinho Verde,s.d.; Oliveira, 2019).

O transporte das uvas é a última etapa a ser efetuada antes das uvas darem entrada na adega. Deve ser feito o mais rapidamente possível e em caixas pequenas de forma a que o início da fermentação seja evitado (Vinho Verde, s.d.).

Com a receção das uvas na adega inicia-se o processo de vinificação do Vinho Verde Branco, esquematizado na Figura 5.

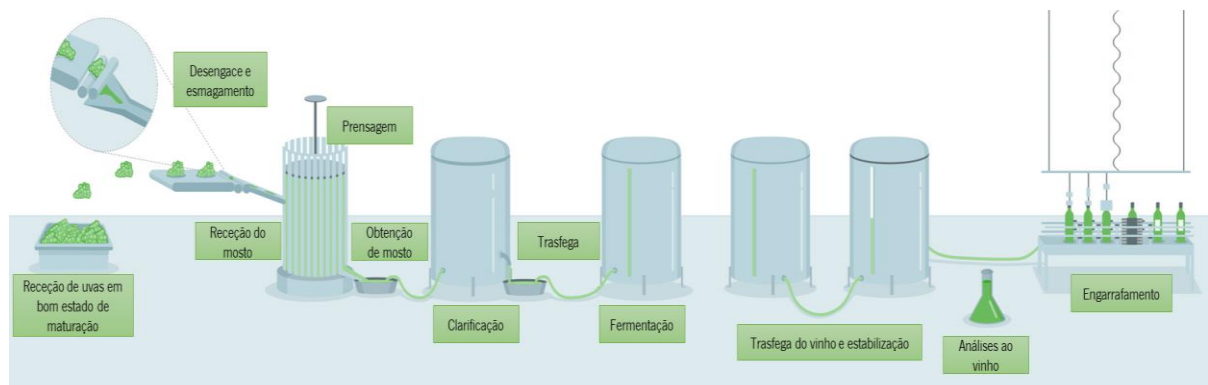


Figura 5: Processo de vinificação do Vinho Verde Branco (adaptado de Vinho Verde, s.d.).

Na etapa de receção das uvas, estas são pesadas e é retirada uma amostra com o intuito de inspecionar a qualidade da vindima, comprovar a variedade das uvas e determinar o teor de açúcares e a acidez. Nesta fase poderá ser feita uma triagem para eliminar corpos estranhos, uvas podres e uvas verdes. A triagem pode ser feita só a seguir ao desengace (Oliveira, 2019; Quinta dos Vales, s.d.).

O desengace tem como finalidade a remoção do engaço (estrutura do cacho), das folhas e de outros materiais. Este procedimento é muito importante, uma vez que os engaços contêm na sua composição taninos indesejados, que desta forma não vão para o mosto (Oliveira, 2019).

O esmagamento tem como objetivo rebentar os bagos de uva, sem danificar as grainhas. Esta operação permite libertar o máximo de mosto e colocar as leveduras presentes na película, e outras substâncias ativadoras da fermentação, em contacto com o sumo. Permite, igualmente, arejar o mosto, assegurando um bom arranque da fermentação alcoólica (Oliveira, 2019; Jackson, 2014).

A prensagem é a operação que consiste na extração de líquido, mosto ou vinho, através de forças aplicadas sobre os bagos (no caso dos vinhos brancos). A prensagem realizada por períodos longos sob pressões muito baixas e num regime suave origina vinhos brancos de qualidade superior. Porém, como é um processo muito demorado, nem sempre é possível a sua realização nestas condições (Jackson, 2014; Clube vinhos portugueses, s.d.).

A clarificação é realizada, geralmente, por decantação e consiste na remoção da maior parte dos sólidos em suspensão no mosto (borras). A remoção destas borras é importante para minimizar as oxidações excessivas catalisadas pelas enzimas, para melhorar as características organolépticas do vinho e para tornar a cor do vinho menos intensa. Porém, a clarificação excessiva é prejudicial pois pode eliminar substâncias importantes para o desenvolvimento de leveduras – diminuindo a eficácia da fermentação alcoólica, e pode eliminar substâncias do aroma varietal (ou aroma primário do vinho – resultante de compostos presentes no bago da uva), acarretando uma perda de tipicidade do produto (Oliveira, 2019; Jackson, 2014). Nesta etapa há adição de enzimas – PEC's, que têm como objetivo hidrolisar a pectina do mosto, melhorando o processo de clarificação e de extração de compostos importantes da película das uvas (Belda et al., 2016).

2.4.2 Fermentação

A fermentação alcoólica consiste na degradação dos açúcares do mosto da uva, por leveduras selecionadas, com produção de álcool e libertação de CO₂ (Jackson, 2014 & Vida e Vinho, s.d.).

Quimicamente, a fermentação é uma forma de metabolismos de libertação de energia onde, quer o substrato quer o produto final (doador inicial e aceitador final de eletrões, respetivamente) são compostos orgânicos (Jackson, 2014 & Vida e Vinho, s.d.).

Na fermentação alcoólica, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a escolha usual. Esta apresenta uma grande capacidade fermentativa, sendo a glucose e a frutose os dadores iniciais de eletrões (substrato), e o etanol o aceitador final de eletrões (produto final). Devido à capacidade de suportar concentrações moderadas de etanol, de ser osmotolereante e de ser pouco sensível às variações de acidez, esta levedura é a utilizada para a produção de Vinho Verde branco (Jackson, 2014 & Vida e Vinho, s.d.).

Antes do início da fermentação pode haver necessidade de ajustar alguns parâmetros do mosto, de forma a garantir uma fermentação mais eficiente, como é o caso do pH, acidez total, concentração em ácidos orgânicos e concentração de açúcares. Se a concentração de açúcares no meio não for suficiente para atingir o teor alcoólico desejado no vinho final, deverão ser realizados processos de concentração do mosto – adição de mosto concentrado, osmose inversa ou concentração parcial por arrefecimento, por exemplo (Jackson, 2014 & Vida e Vinho, s.d.).

No fim da fermentação, os resíduos sólidos, a matéria orgânica e as leveduras depositam-se no fundo do tanque. O vinho pode, assim, ser transferido para um recipiente limpo, de modo a evitar que

sabores e aromas indesejáveis da matéria sedimentada passem para o vinho. O ato de transferir o vinho de um recipiente para outro é conhecido como trasfega (Jackson, 2014 & Vida e Vinho, s.d.).

No fim da fermentação e da trasfega, o vinho é estabilizado. O processo de estabilização consiste em submeter o vinho a alguns processos de filtração onde são removidos componentes que podem deixá-lo turvo e na adição de SO₂. Esta etapa vai permitir que o vinho seja estável ao calor - vinho quando exposto a temperaturas mais altas não se tornará turvo; ao frio - o vinho não formará cristais quando submetido a temperaturas mais baixas; e estável microbiologicamente - o vinho não sofrerá novas fermentações após engarrafamento (Oliveira, 2019; Vida e Vinho, s.d.).

Por fim, o vinho é engarrafado. Para garantir uma boa evolução do vinho na garrafa é necessário garantir que esteja o mais límpido possível, não apresente defeitos enunciados nas provas e que esteja devidamente protegido, de forma a evitar a oxidação (Vinho Verde, s.d.).

2.4.3 Resíduos resultantes da produção de vinho

Resíduos sólidos

A maior parte dos resíduos gerados derivam das atividades relacionadas com o processo produtivo - descarga, esmagamento, prensagem, trasfega e filtração, das atividades de manutenção e limpeza das instalações e equipamentos (Lopes, 2015).

Alguns dos resíduos gerados através destas atividades são: engaço, bagaços, borras, grainhas, folhelhos (pedúnculos das uvas), bagos rejeitados, folhas, terras filtrantes, farpas de madeira, madeira, papel e cartão, vidro, plástico, rolhas de cortiça e de plástico, embalagens de produtos enológicos e de agentes de higienização (Lopes, 2015; Marçal, 2014).

Muitos destes resíduos são considerados subprodutos, podendo ser usados como matéria-prima para processos subsequentes. Destes resíduos aqueles que são considerados como subprodutos orgânicos com maior potencial são o engaço, o bagaço e as borras (Marçal, 2014).

Os engaços constituem os resíduos de menor valorização, e apresentam um teor de humidade de cerca de 50 %, sendo que na parte seca predomina a celulose (cerca de 30 % a 40 %), seguida da lenhina e da matéria tartárica. Estas características impossibilitam o uso dos engaços em alimentação animal. Sendo assim, o seu aproveitamento é restrito ao uso como um dos componentes da matéria-prima para a Indústria de Papel e da Construção, podendo, ainda, ser usado como combustível e adubo. Porém, a aplicação dos engaços na fertilização dos solos requer alguma atenção, uma vez que, se a concentração de polifenóis nos engaços for muito elevada, pode causar efeitos adversos no ambiente e inibição da germinação (Regulamento (CE) n° 479/2008; Marçal, 2014; Silva, 2003). A celulose obtida

dos engaços pode também ser usada para a obtenção de polímeros naturais e/ou naturais modificados como excipientes farmacêuticos (substância farmacologicamente inativada usada como veículo para o princípio ativo, ajudando na sua preparação ou estabilidade) para a formulação de cosméticos e medicamentos (Regulamento (CE) n° 479/2008; Marçal, 2014; Silva, 2003).

Relativamente aos bagaços, estes constituem os resíduos mais abundantes do processo vitivinícola (representa cerca de 12 % a 15 % em peso da matéria-prima inicial), pois são constituídos pelos resíduos resultados da prensagem e esmagamento das uvas (películas, grainhas, folhelhos e alguns restos de engaços) e pelo mosto ou conjunto mosto-vinho que impregna as partes sólidas já referidas (Regulamento (CE) n° 479/2008 ; Marçal, 2014; Silva, 2003). O bagaço constitui também o principal subproduto do processo de vinificação devido à sua elevada riqueza em teor alcoólico, ácido tartárico, açúcares, hidratos de carbono, proteínas, lípidos, polifenóis, taninos, pectinas, celulose, sais minerais e ésteres (Regulamento (CE) n° 479/2008; Marçal, 2014 & Silva, 2003). No entanto, as características dos bagaços dependem do tipo de vinho produzido e da tecnologia usada e, por isso, podem existir diferentes classificações, como por exemplo (Regulamento (CE) n° 479/2008; Marçal, 2014; Silva, 2003):

- Bagaço doce ou fresco - este bagaço não fermenta com o mosto e por isso é composto por um líquido com grandes teores de açúcares e pouco, ou mesmo nenhum, álcool. Estes bagaços requerem uma fermentação, a fim de transformar os açúcares em etanol, antes de serem destilados.
- Bagaço fermentado – este bagaço resulta do processo de vinificação com maceração. Neste caso há fermentação do mosto em contacto com as partes sólidas dos cachos de uvas, que depois de prensadas incluem uma parte de vinho e, por isso, também de álcool.

Borra é a denominação dada aos depósitos de resíduos que ficam nos equipamentos após a realização da fermentação, durante a armazenagem ou após o tratamento do vinho e depois das etapas de filtração ou centrifugação do produto (Regulamento (CE) n° 479/2008; Marçal, 2014; Silva, 2003). As borras são um conjunto de vários resíduos, como é o caso de substâncias tartáricas, restos de engaço, grainhas e películas - que não foram totalmente removidos, leveduras, taninos, sulfatos e uma pequena quantidade de vinho (Regulamento (CE) n° 479/2008; Marçal, 2014; Silva, 2003). As borras obtidas dependem de vários fatores, como é o caso das características inerentes às diferentes castas, estado da maturação, estado higiénico da vindima, técnicas de vinificação usadas e condições climáticas

(Regulamento (CE) n° 479/2008; Marçal, 2014; Silva, 2003). As borras constituem um subproduto valioso, pois através da recuperação da sua componente líquida permitem obter diversos produtos diferentes (Regulamento (CE) n° 479/2008; Marçal, 2014; Silva, 2003):

- Por destilação direta permitem obter aguardente vínica ou álcool etílico;
- É possível extrair o tartarato de cálcio, a partir do qual se obtém ácido tartárico;
- Em destilarias de álcool vínico, estas borras são diluídas permitindo recuperar, por centrifugação, cerca de 10 % de material em suspensão do qual grande parte corresponde ao bitartarato de potássio;
- Extraindo o álcool das borras, estas depois podem ser utilizadas como fertilizantes;
- Poder haver extração de leveduras, que posteriormente podem ser usadas na compostagem juntamente com os bagaços.

Efluentes vinícolas

A produção de vinho é feita em diversas etapas, cuja quantidade e a qualidade dos efluentes líquidos gerados é bastante diversa. A natureza do efluente líquido pode variar na carga poluente, na carga hidráulica, nas técnicas usadas na produção, no período de funcionamento e no tipo de vinho, sendo que na indústria vitivinícola existe um elevado consumo de água e, por conseguinte, são gerados elevados caudais de efluentes líquidos, que, de acordo com Vieira, 2009, se devem, essencialmente, às seguintes operações: à lavagem dos equipamentos e cubas durante o processo de produção de vinho; durante as operações de receção das uvas, desengace e esmagamento, as águas residuais resultam igualmente da lavagem dos contentores onde se encontram as uvas, do equipamento utilizado para o desengace e para o esmagamento e do pavimento da adega; nas restantes operações, as águas residuais são geradas a partir da lavagem de equipamentos, como as cubas de fermentação e os tanques/barris de maturação; na realização da trasfega do vinho ocorrem perdas, sendo necessário lavar o pavimento da adega; e por fim, na etapa de engarrafamento resultam águas residuais da lavagem das cubas, das garrafas, das máquinas de engarrafamento e do armazém.

As cargas poluentes dos efluentes dependem do período de trabalho (vindima, trasfegas, engarrafamento) e das tecnologias usadas para a produção dos diferentes tipos de vinhos. Estes efluentes são compostos por duas fases - solúvel e insolúvel. A fase solúvel caracteriza-se por ser facilmente biodegradável (substâncias orgânicas e minerais provenientes da uva, do vinho, dos produtos enológicos e dos produtos de limpeza), e a fase insolúvel apresenta baixa biodegradabilidade (partículas

orgânicas e minerais grosseiros) (Cardoso, 2015). Estes efluentes vinícolas, devido à sua composição, provocam um grande impacto ambiental nos locais onde são descarregados. Quando a descarga é feita num meio natural, como num rio, os microrganismos degradam a matéria orgânica e consomem o oxigénio presente na água, tornando-o indisponível para a fauna. Os efluentes podem provocar outras consequências - alterações de pH, temperatura e ocorrência de eutrofização dos rios devido à presença de excesso de nutrientes (carbono, azoto, fósforo) (Cardoso, 2015). Os efluentes vinícolas têm um impacto ambiental notório devido, essencialmente, aos grandes volumes produzidos com elevada carga orgânica/inorgânica. Para minimizar esse impacto, estes devem ser tratados: geralmente, os sólidos suspensos são removidos por tratamento físico - grades, desareadores, flotadores e decantadores, e as substâncias dissolvidas sofrem um tratamento químico e/ou biológico (Cardoso, 2015).

Emissões

No setor da vinha e do vinho os gases libertados em maiores quantidades são o dióxido de carbono (CO_2), o metano (CH_4), o óxido nitroso (N_2O), o hexafluoreto de enxofre (SF_6), os clorofluorcarbonetos (CFC's), os hidrofluorcarbonetos (HFC's) e os perfluorcarbonetos (PFC's) (OIV, 2015). De todos estes gases, aquele que tem maior peso, ou seja, o que é libertado em maior quantidade ao longo do ciclo de vida do vinho é o CO_2 (OIV, 2015). Na viticultura, o CO_2 é emitido durante o processo de respiração das vinhas. Para além disso o CO_2 e N_2O provêm do uso de fertilização e de maquinaria agrícola (Batista, 2019; Zanden, 2009; Trombly & Fortier, 2019).

Durante as fases de desengace, esmagamento, fermentação e filtração são utilizados sistemas de refrigeração para controlo de temperatura, o que gera emissões devido à necessidade do uso de fluidos de refrigeração para o seu bom funcionamento. Estes fluidos são compostos por CFC's e HFC's, que possuem um potencial de aquecimento global elevado (Batista, 2019).

A fermentação pode englobar a fermentação alcoólica, onde o açúcar presente na matéria prima é transformado em etanol por ação de microrganismos, e a fermentação malolática onde o ácido málico é convertido a ácido láctico. Em ambos os processos há emissão de quantidades significativas de CO_2 . As emissões provenientes da fermentação representam 15 % a 24 % das emissões da vinificação sendo que, a nível do processo global corresponde a cerca de 2 % - 3 % do total das emissões (Bosco, et al., 2011).

A fase de embalamento é a que regista maiores emissões de gases de efeito estufa, tendo em consideração todo o ciclo de vida dos materiais – extração da matéria-prima, tratamento e transporte dos produtos de embalamento, engarrafamento e embalamento e disposição dos materiais após uso

pelo consumidor final (Batista, 2019). Aproximadamente 0,33 kg CO₂ / garrafa de vinho, de 0,75 L, é emitido para a atmosfera nesta fase, representado 32 % das emissões de gases de efeito estufa, ao longo de todo o processo de vinificação (Bosco, et al., 2011).

Por outro lado, no setor vitivinícola existem outros equipamentos responsáveis pela emissão, direta ou indireta, de gases com potencial de aquecimento global, como é o caso de sistemas de ar condicionado e equipamentos de refrigeração (Dias, 2016).

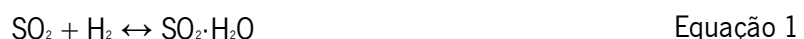
2.5 Métodos de conservação do mosto e do vinho

2.5.1 Método tradicional – SO₂

O enxofre está presente naturalmente nas películas das uvas, porém este não existe em quantidades suficientes para evitar a deterioração para fins de vinificação. Por esta razão, o SO₂ é usado no processo de produção do vinho, devido às suas propriedades de conservação (Demidov, et al., 1999). A adição de SO₂ é um método de controlo microbiano que pode ser aplicado antes da fermentação, com o objetivo de conservar o mosto, ou depois da fermentação, de forma a evitar a degradação do vinho (Boulton, et al., 1999). O SO₂ impede que o vinho reaja com o oxigénio, responsável pelo escurecimento e aparecimento de odores, e inibe o crescimento microrganismos – bactérias e leveduras – e enzimas indesejáveis no mosto e no vinho (Demidov, et al., 1999).

O SO₂ no mosto/vinho pode existir em dois estados - forma livre e forma combinada (Oliveira, 2019; Boulton, et al., 1999). O dióxido de enxofre livre é definido como o dióxido de enxofre presente no mosto ou no vinho na forma molecular – SO₂, de ião de sulfito – SO₃²⁻, e de ião bissulfito - HSO₃⁻. O SO₂ pode ligar-se a outras moléculas, como é o caso de açúcares e alguns ácidos e acetaldeídos, originando o SO₂ combinado (Oliveira, 2019; Boulton, et al., 1999). O SO₂ total é definido como a soma de todas as suas formas presentes no vinho, quer no estado livre quer no estado combinado, contudo apenas a sua fração livre apresenta interesse enológico (Oliveira, 2019; Boulton, et al., 1999).

O SO₂ quando é misturado com água apresenta um equilíbrio entre as três formas livres: a molecular, a de ião bissulfito e a de ião sulfito, de acordo com as seguintes equações (Henderson, 2009):



O equilíbrio entre estas três formas é dependente do pH, conforme se encontra na Figura 6 (Henderson, 2009).

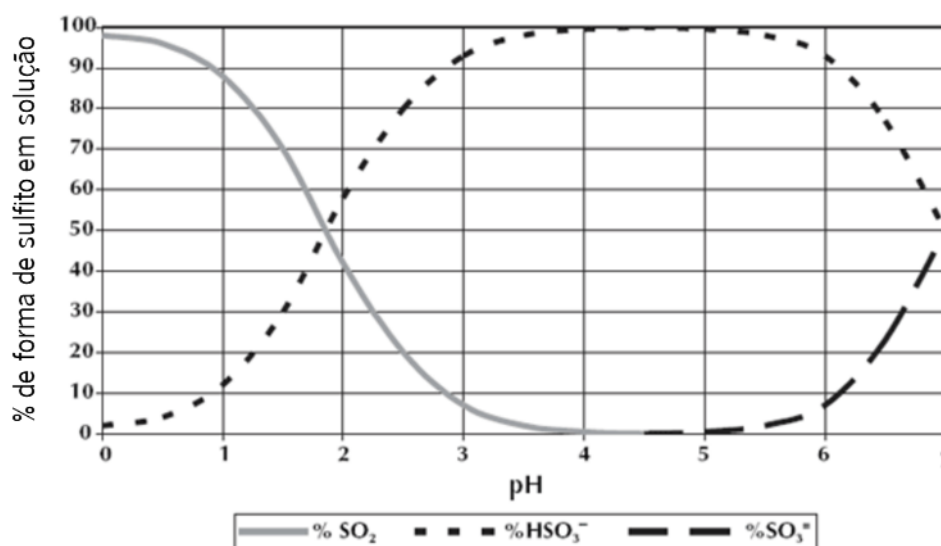


Figura 6: Gráfico referente à relação entre a percentagem de enxofre sob diversas formas mediante o pH do meio (adaptado de Henderson, 2009).

Pela Figura 6 é notório que mediante a variação do pH do meio, a quantidade de cada forma de enxofre em solução é diferente. Como o pH dos vinhos está normalmente entre 3 e 4, a forma de bissulfite é a predominante (Henderson, 2009).

O SO₂ molecular é a forma mais importante no vinho pois é responsável pela atividade antimicrobiana e antioxidante. Existe tanto na forma de gás como na forma de moléculas livres no mosto e no vinho, sendo, também, responsável pelo odor e sabor a sulfuroso. A forma de ião bissulfite provoca a inativação de enzimas responsáveis pelo escurecimento oxidativo dos mostos e vinhos. O bissulfite é inodoro, porém é responsável pelo aparecimento de um gosto amargo. O ião sulfite é a forma em que existe em menor quantidade no vinho e é a única que reage diretamente com o oxigênio. Esta forma é inodora e insípida nas concentrações normalmente utilizadas nos vinhos (Oliveira, 2019; Boulton, et al., 1999).

O SO₂ pode ser também produzido pelas leveduras (SO₂ endógeno) através dos sulfatos existentes no mosto. Esta produção não é regulada, pois não depende, unicamente, das condições de fermentação ou de fatores de stress, mas está, principalmente, relacionada com as características intrínsecas das leveduras. As leveduras indígenas são aquelas que apresentam maior aptidão para a produção de SO₂ endógeno, porém a sua produção é favorecida pelo arejamento, clarificação,

aquecimento e carência em aminoácidos contendo enxofre (metionina e cisteína) e tiamina (Oliveira, 2019; Boulton, et al., 1999). O SO₂ é um metabolito intermediário na via de assimilação do sulfato, por parte das leveduras indígenas, existentes no mosto. Sob determinadas condições, o SO₂ pode ser sintetizado em excesso e libertado para o meio. A produção do SO₂ endógeno poderá elevar a concentração de SO₂ tornando-se prejudicial pois, para além de elevar o nível de SO₂ acima dos limites legais, poderá inibir o desenvolvimento de bactérias lácticas, atrasando ou inibindo a fermentação malolática e poderá ter um impacto negativo nas propriedades sensoriais do vinho, interferindo na sua qualidade final (Blondin, s.d.; Ribéreau-Gayon, et al., 2006). A produção de SO₂ endógeno não é benéfica e, por isso, de forma a evitar a sua formação, as leveduras indígenas são inibidas, sendo o mosto inoculado com uma estirpe de levedura do género *Saccharomyces* que produza pouco SO₂ endógeno (Blondin, s.d.).

O SO₂ é adicionado ao mosto ou ao vinho sob diversas formas (Oliveira, 2019):

- Forma sólida – metabissulfito de potássio em pó;
- Solução sulfurosa – solução comprada já preparada, existindo em diversas concentrações;
- SO₂ gasoso;
- Solução de bissulfito de potássio – solução comprada já preparada, existindo em diversas concentrações.

O SO₂, no mosto e no vinho, apresenta várias propriedades (Oliveira, 2019; Boulton, et al., 1999):

- Propriedade antisséptica – inibe e destrói leveduras e bactérias;
- Propriedade antioxidante – protege os compostos fenólicos e os compostos odoríferos da oxidação;
- Propriedade antioxidásica – inibe e destrói a atividade das enzimas oxidativas, nomeadamente, sobre compostos fenólicos;
- Propriedade dissolvente – acelera a necrose das células da uva, principalmente da película.

No entanto, e apesar destas vantagens, uma pequena parte da população é potencialmente alérgica ao SO₂ e, por esta razão, os produtores de vinho são obrigados, por lei, a manter determinados

níveis fixos de SO₂ (Henderson, 2009; Regulamento (CE) N.º 606/2009). Segundo o Regulamento (CE) 606/2009 da Comissão de 10 de julho de 2009, o limite legal para o teor total de SO₂, na altura da colocação do produto no mercado para consumo humano direto, deve ser igual ou inferior a 200 mg/L para vinhos branco, havendo a possibilidade de atingir os 250 mg/L se o teor de açúcares no vinho (glucose e frutose) for superior a 5 g/L (Henderson, 2009; Regulamento (CE) N.º 606/2009).

O SO₂ apresenta um efeito inibitório em todas as leveduras, no entanto, o uso de leveduras selecionadas, como do género *Saccharomyces* spp., na fermentação alcoólica são mais resistentes do que as leveduras “selvagens” (leveduras, naturalmente, presentes nas uvas e na adega). As leveduras “selvagens”, por vezes, podem ser a fonte de sabores desagradáveis do vinho e, por isso, os produtores decidem controlá-las, adicionando uma pequena dose de SO₂ e inoculando o mosto com uma estirpe comercial de *Saccharomyces*, como por exemplo a levedura KB 12, da marca BioEno, que é uma levedura indicada para a fermentação de vinhos verde branco (Divol, et al., 2012; BioEno,s.d.).

A fermentação malolática é uma fermentação secundária efetuada por bactérias que convertem o ácido málico em láctico. *Oenococcus oeni* é uma das principais bactérias responsáveis por esta fermentação e é muito sensível ao SO₂. Como esta fermentação nem sempre é pretendida, os produtores usam muitas vezes o SO₂ para impedir que esta ocorra (Jackson, 2014; Divol, et al., 2012).

O sabor dos vinhos brancos é beneficiado pela natureza conservadora do SO₂. O momento da sua adição afetará o carácter final do vinho. Desta forma, se o SO₂ for adicionado antes da fermentação alcoólica, a enzima Polifenoloxidase - PPO é inibida. Com esta inibição ocorrerá menos escurecimento oxidativo do mosto e haverá preservação dos aromas frutados e florais (Divol, et al., 2012).

A ausência de adição de SO₂ após a fermentação alcoólica permite que a fermentação malolática se inicie logo de seguida, diminuindo a acidez do vinho e tornando-o microbiologicamente estável. Após o término da fermentação malolática, deve ser adicionado SO₂ para proteger o vinho. Porém, e como acima referido, se não se pretender que esta ocorra, deve ser adicionado SO₂ logo após a conclusão da fermentação primária (fermentação alcoólica) (Jackson, 2014; Divol, et al., 2012).

O SO₂ tem diferentes impactos nas células dos microrganismos. Os danos causados variam com a fase do crescimento celular em que eles se encontram e da tolerância que eles apresentam a este composto (Divol, et al., 2012).

Os microrganismos são capazes de responder a diversas mudanças nas condições ambientais. Quando estas ameaçam a sobrevivência ou dificultam a vida dos microrganismos em condições ideais, as células entram em stress. A capacidade de os microrganismos crescerem e sobreviverem em condições desfavoráveis é o resultado de reações de resposta ao stress (Jackson, 2014; Divol, et al.,

2012). O vinho é um bom exemplo de um meio que, devido às constantes alterações que sofre, requer adaptação constante dos microrganismos que lá existem. Quando o SO₂ é adicionado ao vinho, muitas das células presentes, como resposta a este stress, entram num estado de sobrevivência conhecido por VBNC – *Viable But Non Culturable*. Neste estado, as células estão metabolicamente ativas, mas incapazes de crescer. Contudo, após a remoção deste stress, as células são capazes de entrar num estado totalmente viável e de voltar a crescer (Jackson, 2014; Divol, et al., 2012).

No caso de o SO₂ ser adicionado ao mosto, é necessário removê-lo antes da fermentação, de modo a que as leveduras inoculadas possam sair do estado de VBNC e fermentar o mosto (Jackson, 2014; Divol, et al., 2012). De acordo com o Regulamento 606/2009 da Comissão de 10 de julho de 2009, a eliminação do SO₂ deve ser feito por processos físicos. Devido às suas características voláteis, este composto pode ser removido do vinho por ação térmica. O mosto contendo SO₂ é aquecido a 120 °C, durante 10 min numa coluna de destilação fracionada permitindo a remoção do SO₂ na forma de vapor. Este vapor deve ser, posteriormente, neutralizado através de uma solução de óxido de cálcio (Jackson, 2014; Divol, et al., 2012; Tecnilab,s.d.).

2.5.2 Método alternativo – AO

O AO, também denominado de aquecimento Joule, aquecimento por resistência elétrica, aquecimento direto por resistência elétrica, aquecimento elétrico e aquecimento eletrocondutor, é um processo no qual um dado material é aquecido através da passagem de uma corrente elétrica alternada (Gavahian, et al., 2019; Siguemoto, et al., 2020). Neste aquecimento, o calor é gerado internamente, dentro do material, devido à sua resistência à corrente elétrica aplicada. A quantidade de calor gerado está diretamente relacionado com o gradiente de tensão e condutividade elétrica (Martín-Belloso & Morales-de la Peña, 2018). Por esta razão, o AO é visto tanto como uma tecnologia de produção interna de energia, que não depende do mecanismo clássico de transferência de calor, como condução e convecção (Knirsch, et al., 2006; Siguemoto, et al., 2020). Esta tecnologia baseia-se na aplicação direta de campos elétricos de intensidade moderada (< 1000 V/cm) e, por esse motivo, frequentemente denominada como electro-aquecimento ou MEF (Campos Elétricos Moderados) (Rocha, et al., 2018; Sastry, 2008).

Os dispositivos de AO podem operar em batch ou em modo contínuo. De forma genérica estes dispositivos são compostos por um par de elétrodos que estejam em contacto direto com alimentos, e que delimitam a zona de tratamento. Estas unidades geralmente consistem num reator tubular, fonte de energia e outros acessórios relacionados à segurança do equipamento, assim conexões com outras

unidades e / ou processos operacionais (Tarigan, 2013). Na Figura 7 encontra-se um esquema de uma instalação de AO onde estão identificados alguns dos componentes base (Durance, 2002).

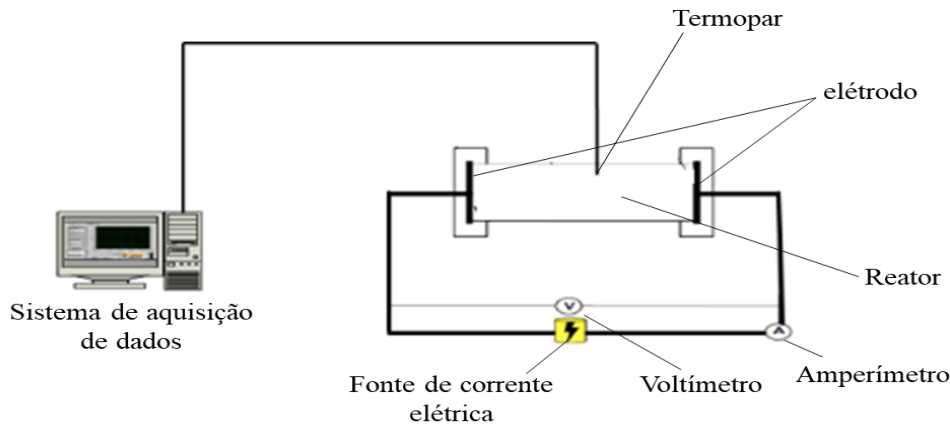


Figura 7: Componentes de uma instalação de AO (adaptado de Durance, 2002).

Na Figura 7, encontra-se um exemplo de um esquema de AO em batch, composto por 2 eletrodos (terminais usados para conectar um circuito elétrico), um reator cilíndrico (local onde é colocada a amostra a tratar), um termopar (sensor de temperatura), um voltímetro (unidade de controlo da voltagem aplicada), um amperímetro (unidade de controlo da corrente elétrica), uma fonte de corrente elétrica (para permitir o funcionamento do sistema) e um sistema de aquisição de dados (Icier, 2012; Tarigan, 2013).

O objetivo principal deste sistema é o de aquecer através da conversão de energia elétrica em energia térmica, devido à resistência elétrica dos alimentos (Brochier, et al., 2019; Cappato, et al., 2017). Essa conversão de energia é baseada na lei de Joule – a passagem da corrente elétrica alternada através de um material semicondutor (alimento) resulta num movimento de partículas carregadas presentes no alimento, que provoca um aumento na vibração das partículas e na sua energia cinética, havendo geração de calor interno (Gavahian, et al., 2019) de acordo com as seguintes equações:

$$Q = I^2 \times R \times t \text{ (I constante ao longo do tempo)} \quad \text{Equação 4}$$

$$Q = R \times \int_{t_1}^{t_2} I^2 dt \text{ (I não constante ao longo do tempo)} \quad \text{Equação 5}$$

Nestas equações, Q representa o calor gerado, o I a intensidade da corrente elétrica, o R a resistência do alimento e o t a duração ou intervalo de tempo.

A eficácia do processo de AO está relacionado com a taxa de aquecimento, que depende de condições intrínsecas (parâmetros de processamento) e extrínsecas (propriedades do produto e do ambiente circundante) nas quais é realizado (Tarigan, 2013; Kaur, 2016).

Na Tabela 1 encontram-se os principais parâmetros que afetam este processo (Cappato, et al., 2017):

Tabela 1: Principais parâmetros do AO

Parâmetros	Fatores
Parâmetros de processamento	Intensidade do campo elétrico
	Tempo
	Temperatura
	Frequência da corrente elétrica
Parâmetros dos produtos	Condutividade elétrica
	Viscosidade
	Densidade
	Calor específico
	Sistemas homogêneos ou sólido-líquido
	Tendência de formação de incrustações
Parâmetros do equipamento	Tamanho do espaço de reação
	Tamanho e forma dos eletrodos
	Composição do eletrodo
	Configuração Batch ou Contínua

Os parâmetros de processamento mais importante são a intensidade do campo elétrico que varia com a tensão elétrica aplicada e a frequência elétrica, uma vez que estes dois parâmetros influenciam a taxa de aquecimento (Gavahian, et al., 2019; Cappato, et al., 2017). A intensidade do campo elétrico – volt por centímetro (V/cm) é uma expressão quantitativa da intensidade de um campo elétrico num local específico. A tensão elétrica - volts (V) - provém da fonte principal de alimentação, que pode ser um alternador, um gerador ou uma bateria, e representa a diferença de potencial elétrico entre dois pontos. A frequência elétrica – hertz (Hz) diz respeito ao número de ciclos por segundo numa onda sinusoidal de corrente alternada, ou seja, corresponde à taxa na qual a corrente muda de direção por segundo, sendo que um hertz corresponde a um ciclo por segundo (Icier, 2012).

O parâmetro do alimento mais importante é a condutividade elétrica, que depende da temperatura e das várias características associadas aos alimentos a serem processados - viscosidade, textura, teor de sólidos, tamanho de partícula, concentração iônica e presença de componentes como gordura, açúcar e gases (Gavahian, et al., 2019; Cappato, et al., 2017; Kaur, 2016). A condutividade térmica de um material indica a sua capacidade de transportar corrente elétrica (Kaur, 2016), influenciando, igualmente, a taxa de aquecimento. Aumenta linearmente com o aumento da temperatura, mas diminui com o aumento do teor em sólidos. Para a maioria dos alimentos sólidos, a condutividade aumenta, acentuadamente, com a temperatura, até cerca dos 60 °C, devido à degradação dos materiais da parede celular, havendo libertação, para o meio, de compostos iônicos. Para alimentos líquidos, a condutividade térmica tem uma relação linear com a temperatura, porém se houver componentes não polares (e por isso não condutores), diminui (Castro, et al., 2004; Müller, et al., 2020). A relação linear entre condutividade e temperatura nem sempre é observada, pois as altas temperaturas podem favorecer a formação e expansão de bolhas de ar no interior dos alimentos, levando a uma redução na condutividade elétrica (Cappato, et al., 2017). Grande parte dos alimentos contém cerca de 30 % de água, onde se encontram dissolvidas várias espécies iônicas, como é o caso de sais e de ácidos, que beneficiam o processo de AO, porque tornam os alimentos eletricamente condutivos (Halden, et al., 1990). Os álcoois, açúcares, óleos e gorduras puras não são adequados ao tratamento realizado pelo AO, pois têm elevada resistência (oposição à passagem de corrente elétrica). Soluções salinas demasiado concentradas também não são materiais adequados pois são altamente condutores deixando passar a maior parte da corrente elétrica.

Relativamente aos parâmetros do equipamento, a área de contato entre os eletrodos e os alimentos, bem como a distância entre eles afetam a taxa de aquecimento (Gavahian, et al., 2019).

O AO apresenta diversas características que lhe dão algum destaque, como é o caso (Icier, 2012; Cappato, et al., 2017; Sastry, 2008):

- Limite de temperatura superior indefinido – o AO permite atingir temperaturas muito altas (bastante superiores às dos processos de aquecimento convencionais), o que possibilita aquecer rapidamente as misturas;
- Taxa de aquecimento controlável – a taxa de produção de calor pode ser modificada pela manipulação da força do campo elétrico;
- Eficiência energética – praticamente toda a energia fornecida aos materiais é usada e, por isso, as eficiências deste processo costumam situar-se acima de 95 %;

- Processamento dos materiais (sólidos e líquidos) mais curtos e com um maior rendimento;
- Utilizado numa ampla gama de aplicações – pré-aquecimento, branqueamento, pasteurização, esterilização, extração de produtos alimentícios;
- Uniformidade do aquecimento – o AO depende da produção interna de energia, e por isso tanto os materiais sólidos numa mistura sólida-líquida, como os fluidos são aquecidos à mesma taxa. Porém, ainda que com menos ocorrência, quando comparado com outros processamentos, o aquecimento não uniforme também é verificado no AO. Regiões com temperaturas mais altas - pontos quentes - e regiões com temperaturas mais baixas - pontos frios - podem aparecer devido à distribuição não uniforme do campo elétrico. Os pontos quentes são causados por regiões dos alimentos onde a condutividade elétrica é mais alta. Estas regiões não apresentam um problema de segurança alimentar, no entanto, o processamento excessivo de alimentos nessas regiões afeta a sua qualidade. Os pontos frios são o resultado de regiões em alimentos onde a condutividade elétrica é menor. Estas regiões, ao contrário dos pontos quentes, são consideradas pontos críticos na segurança alimentar.

O efeito térmico do AO é considerado o principal responsável pela inativação da atividade microbiana e enzimática indesejável nos alimentos (Gavahian, et al., 2019). O AO é preferível aos processos térmicos convencionais, pois permite maior eficiência e cinética de aquecimento, garantindo maior capacidade de retenção da qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (Brochier, et al., 2019). No branqueamento através do AO, os problemas de difusão são muito menores, pois é necessário menos tempo de processamento para obter maiores taxas de inativação, proporcionando maior preservação das características nutricionais e sensoriais dos alimentos e menor consumo de energia, o que torna esse tratamento mais eficaz (Gavahian, et al., 2019; Tarigan, 2013). A pasteurização e esterilização realizadas pelo AO permitem obter melhor qualidade do produto, evitar limitações de difusão de calor e redução no tempo de processamento (Gavahian, et al., 2019; Tarigan, 2013).

Apesar do principal interesse do AO nos alimentos se dever ao seu efeito térmico, o efeito não térmico desta tecnologia, resultante da aplicação de campos elétricos moderados, tem sido notório e tem sido a razão da realização de novos estudos, uma vez este que pode influenciar a inativação microbiana e enzimática indesejável, mas também potencializar a ativação de enzimas benéficas nos alimentos (Sastry, 2008).

Efeito do AO nos microrganismos

A inativação microbiana pelo AO deve-se, essencialmente, ao efeito da temperatura, uma vez que este tratamento possibilita o aquecimento a temperaturas elevadas, simulando processos de pasteurização. Porém, este tratamento apresenta, igualmente, um efeito não térmico através da presença de campos elétricos capazes de causar danos celulares nos microrganismos (Knirsch, 2006).

A utilização deste tratamento a temperaturas e campos elétricos moderados tem permitido alcançar bons efeitos de inativação microbiológica, sendo capaz de provocar maiores velocidades de morte microbiana do que as metodologias tradicionais (Knirsch, 2006). Os campos elétricos do AO quando aplicados a baixas frequências elétricas (50 – 60 Hz) e com intensidade abaixo de 1000 V/cm permitem, também, a inativação microbiana, mesmo quando aplicados em temperaturas subletais (< 45 °C) (Machado, et al., 2010; Rocha, et al., 2018). Os efeitos elétricos causados por este tratamento não podem ser, contudo generalizados para todos os microrganismos, e não existe ainda muita compreensão acerca dos mecanismos de inativação elétrica. É necessário a realização de mais estudos de forma a que este efeito possa ser validado (Icier, 2012). Há várias possíveis explicações para as diferenças existentes entre os efeitos causados aos microrganismos pelo AO e pelos métodos convencionais, a saber:

- Com a aplicação do campo elétrico, há aumento de energia nas membranas celulares, provocando um aumento do tamanho dos seus poros, até passarem de poros hidrófobos para poros hidrófilos, a partir dos quais poderá ocorrer difusão livre (Icier, 2012);
- Devido à atração de cargas opostas induzidas na superfície interna e externa da membrana celular, ocorre pressão de compressão, o que provoca uma redução da espessura da membrana, podendo culminar numa rutura irreversível da membrana - hipótese da rutura dielétrica (Icier, 2012);
- Com a pressão provocada pelos iões na membrana, devido à variação do campo elétrico, há formação de orifícios (poros) na membrana celular que provocam alterações na sua permeabilidade, podendo causar rutura da membrana responsável pela morte celular – hipótese da eletroporação (Rocha, et al., 2018; Cappato, et al., 2017). Pensa-se que o processo de aumento da permeabilização da membrana celular ocorra em pequenas escalas temporais, mas permite que os poros formados permaneçam abertos por tempo suficiente para que ocorra a difusão dos materiais, com vazamento de compostos celulares, causando danos irreversíveis para a célula (Sastri, 2008; Cappato, et al., 2017).

Na Indústria Alimentar, já foram vários os alimentos testados usando este tratamento.

Os sumos de fruta são caracterizados por apresentarem elevada acidez e por serem um meio que possibilita o crescimento de alguns tipos de leveduras, bolores e bactérias (Icier, 2012).

Na Tabela 2 encontram-se alguns estudos realizados em dois microrganismos, permitindo analisar as principais diferenças provocadas pelo AO em relação ao aquecimento convencional (AC).

Tabela 2: Efeito da temperatura e dos campos elétricos moderados do AO nos microrganismos, em relação ao AC

Microrganismo	Condições de tratamento		Principais conclusões	Referências
	AO	AC		
<i>Escherichia coli</i>	70 – 90 °C 10 – 20 V/cm	70 – 90 °C	AO provocou taxas de destruição mais altas do que o AC	Icier, 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			AO permitiu maior libertação de componentes intracelulares e provocou danos irreversíveis na sua parede celular, ao contrário do AC	
<i>Escherichia coli</i>	Temperatura ambiente ≤ 1000 V/cm	Temperatura ambiente	50 V/cm: AO provocou taxas de mortalidade muito pequenas > 160 V/cm: AO provoca morte celular muito significativa > 220 V/cm: AO promove taxas de mortalidade de $3 \log_{10}$ ciclos de E.coli em menos de 6 min	Machado, et al., 2010

Icier, 2012 quando comparou os efeitos obtidos pelo AC e pelo AO percebeu que o efeito causado pelo campo elétrico do AO permitia elevar a taxa de mortalidade destes microrganismos, sendo que o mecanismo de inativação microbiana, causado pelo AO, foi o de eletroporação.

Machado, et al., 2010 com o estudo que realizaram concluíram que o campo elétrico é responsável pela morte não térmica das células de *E.coli*, uma vez que as membranas celulares revelaram alterações após expostas ao efeito do campo elétrico moderados (< 1000 V/cm) do AO, provando a sua morte celular.

Efeito do AO nas enzimas

As enzimas são proteína e são intrínsecas a todos os seres vivos. As enzimas podem ser obtidas por várias vias - extração de animais ou de plantas e fermentação com microrganismos (sejam bactérias ou fungos) (Sanromán & Deive, 2018). As enzimas desempenham um papel tecnológico na preparação, no processamento ou na produção de alimentos (Sanromán & Deive, 2018). Várias enzimas são utilizadas na indústria alimentar para diversos fins, como coagulação, produção de cerveja, hidrólise, ruptura celular e modificação da estrutura molecular (Ermis, 2018). Elas podem melhorar as propriedades organolépticas dos alimentos (como odor, sabor e sensação na boca), ajudar no desenvolvimento de novos produtos alimentícios (por exemplo, alimentos ricos em nutrientes e com baixas calorias) e podem ajudar a alcançar taxas mais altas de extração e recuperação de subprodutos (Castro, et al., 2006; Sanromán & Deive, 2018). As enzimas podem ajudar na extração e separação de compostos bioativos de alimentos, como compostos fenólicos, corantes e aromatizantes, e podem aliviar os riscos de segurança de produtos alimentares, decompondo compostos indesejáveis, como o glúten (Zhang, et al., 2018). No entanto, as enzimas também podem ter efeitos prejudiciais na qualidade dos alimentos, como a produção de odores e sabores desagradáveis e alterações nas propriedades texturais (Castro, et al., 2006). Devido aos efeitos benéficos ou prejudiciais das enzimas, é necessário controlar a sua atividade em várias etapas do processamento alimentar, promovendo a ativação ou inibição da atividade enzimática de acordo com o efeito desejado.

Os efeitos do campo elétrico moderado do AO nas enzimas ainda são pouco conhecidos e controversos, pois variam com vários fatores - variação nos gradientes de tensão e campos elétricos, tipo de enzima e matriz alimentar em que o processamento é realizado (Brochier, et al., 2019; Rocha, et al., 2018). No entanto, existem várias explicações para apoiar a inativação enzimática em vários produtos alimentares:

- A atividade catalítica das enzimas é uma função da sua estrutura nativa e de vários fatores externos. Os diferentes aminoácidos existentes estão associados a s enzimas através de diferentes interações moleculares - covalentes e não covalentes - influenciando a estrutura das enzimas. Os campos elétricos podem alterar essas interações, o que pode causar

alterações na estrutura dos sítios ativos ou nas conformações moleculares tridimensionais das enzimas e consequente inibição da atividade enzimática (Castro, et al., 2004; Poojary, et al., 2017);

- As reações eletroquímicas que ocorrem devido à passagem de corrente elétrica, como a eletrólise da água, resultam em compostos que podem interagir com enzimas, causando alterações na estrutura conformacional do seu sítio ativo, o que dificulta a ligação enzima-substrato (Brochier, et al., 2019);
- Os campos elétricos podem causar uma diminuição da atividade enzimática e desnaturação de proteínas devido à remoção de grupos prostéticos metálicos existentes em algumas enzimas – como Lipoxigenase - LOX e PPO (Rocha, et al., 2018; Rodrigues, et al., 2019);
- Termodinamicamente, é possível que os efeitos do MEF possam estar associados aos iões que existem à volta das moléculas da enzima (Rocha, et al., 2018). A colisão adicional desses iões com as moléculas de água existentes no ambiente enzimático pode afetar as condições ideais para a atividade enzimática (Rocha, et al., 2018).

Na Indústria Alimentar o efeito do AO já foi estudado sob algumas enzimas que existem em alimentos, como é o caso das seguintes:

- LOX – Enzima amplamente distribuída em vegetais e está envolvida no desenvolvimento de sabores desagradáveis e perda de cor dos vegetais (Castro, et al., 2006);
- PPO – Esta enzima é responsável pelo escurecimento enzimático dos alimentos devido aos fenóis existentes e que funcionam como substrato desta enzima (Castro, et al., 2006). As mudanças da cor, em alguns casos, são um fator limitante, como no caso de frutas e legumes, em que ocorre um escurecimento rápido durante o processo de corte ou descasque. No entanto, no caso do café, chá preto e cacau, a reação de escurecimento é benéfica, pois melhora suas qualidades (Jukanti, 2017);
- Fosfatase alcalina - ALP – Na indústria alimentar é usada como indicador da eficácia do processamento térmico do leite (Castro, et al., 2006);

- β -galactosidase - β -GAL – Esta enzima degrada a lactose presente nos alimentos. É usada como tratamento de produtos lácteos de forma a torná-los consumíveis por pessoas intolerantes à lactose (Castro, et al., 2006);
- PEC – Nos alimentos, as principais funções desta enzima são a clarificação dos sumos e vinhos, reduzir a viscosidade hidrolisando a pectina, acelerar a taxa de filtração, impedir a formação de gel de pectina e melhorar a extração de cor da pele da uva (Castro et al. 2006);
- Pectinmetilesterase - PME - são pectinases que degradam a pectina por desesterificação, removendo os grupos metoxi (Dalagnol, et al., 2017; Singh, et al., 2019);
- Peroxidase - POD - enzima que pertence ao grupo das oxido-redutases, tendo a capacidade de catalisar um grande número de reações oxidativas, induzindo mudanças negativas no sabor e na cor dos alimentos (Freitas, et al., 2008);
- α -amilase – pertence a uma classe de enzimas responsáveis pela catálise da hidrólise do amido (amilases) (Flores-Gallegos, et al., 2018). Esta enzima é responsável pela clivagem das ligações 1,4-glicosídicas do amido para a obtenção de glicose e maltose. As amilases são usadas na indústria de panificação, de cerveja e na liquefação do amido (Sanromán & Deive, 2018).

Na Tabela 3 encontram-se alguns estudos realizados nestas enzimas, pelo AO e pelo AC, e os respetivos efeitos que provocaram:

Castro et al 2006 aplicaram o mesmo efeito térmico às enzimas, quer pelo AO quer pelo AC, de forma a ser possível eliminar a temperatura como variável e determinar se existe algum efeito adicional não térmico na inativação das enzimas pelo AO. Foi concluído que, apesar de todas as enzimas seguirem uma cinética de inativação de 1ª ordem (quer pelo AO como pelo AC), os campos elétricos do AO apenas inativaram as enzimas que apresentam grupos prostéticos metálicos (LOX e PPO), removendo-os, o que provoca uma diminuição da atividade destas enzimas.

Abdelmaksoud et al 2018 estudaram os efeitos dos parâmetros do AO na inativação de duas enzimas - PPO e PME e na qualidade do sumo de manga não concentrado, comparativamente com o AC. Estes autores concluíram que o AO beneficiava, não só a inativação enzimática destas duas enzimas, como a qualidade e a cor sumo. Os resultados deste estudo permitiram averiguar que o AO pode ser usado como um potencial tratamento térmico suave para prolongar a vida útil e melhorar as características de qualidade do sumo de manga não concentrado.

Tabela 3: Efeito da temperatura, frequência e dos campos elétricos moderados do AO nas enzimas, em relação ao AC

Enzima	Condições de tratamento		Principais conclusões	Referências
	AO	AC		
LOX	60 – 95 °C	60 – 95 °C	Campo elétrico influenciou a inativação enzimática	Castro, et al., 2006
PPO	20 – 90 V/cm			
PEC	50 Hz		Campo elétrico não teve influência na inativação enzimática	
ALP				
β -GAL				
PPO	80 °C	90 °C	Total inativação pelo AO e AC	Abdelmaksoud, et al., 2018
PME	40 V/cm 60 s	60 s	AO permitiu 96 % de inativação AC permitiu 90 % inativação	
POD	75 °C 7,8 V/cm 25 min	75 °C 25 min	Fração líquida: AO permitiu 78 % inativação AC permitiu 72 % inativação Fração sólida: AO permitiu 96 % inativação AC permitiu 89 % inativação	Brochier, et al., 2020
PME	65 °C e temperaturas a baixo e acima deste valor 5; 8 e 10,5 V/cm 60 Hz	65 °C e temperaturas a baixo e acima deste valor	Temperaturas elevadas: AO provocou inativação enzimática Temperaturas baixas: AO provocou ativação enzimática 70 °C e 8 V/cm: AO provoca ativação enzimática bastante significativa	Samaranayake & Sastry, 2016
α -amilase	60 °C 1 V/cm 1 Hz – 1 MHz	60 °C	1 – 60 Hz: AO provoca ativação enzimática significativa 60 Hz: AO permite 41 % ativação enzimática	Samaranayake & Sastry, 2018

Brochier, B et al 2020 estudaram os efeitos do AO na enzima POD existente na fração líquida e sólida do caldo da cana de açúcar (líquido extraído diretamente da cana). O AO e o AC foram aplicados à mesma temperatura com o objetivo de eliminar a variável temperatura e determinar se o efeito elétrico do AO contribui para a inativação desta enzima. Apesar do AO ter permitido uma maior inativação da POD, o que indica que o AO influencia a estrutura conformacional da enzima, a percentagem de inativação variou entre as duas frações do líquido da cana. Esta diferença pode ser explicada pela presença de açúcares e proteínas solúveis na fração líquida que aumentam a estabilidade da enzima. Essas moléculas podem estabilizar a enzima a partir de modificações bioquímicas durante o aquecimento.

Dos poucos estudos que já foram realizados e que estejam relacionados com os efeitos de campos elétricos moderados sobre enzimas alimentares, para além de haver uma relação do AO com a inativação enzimática, surgiu uma possível ligação desta tecnologia com a ativação enzimática.

Samaranayake & Sastry, 2016 e Samaranayake & Sastry 2018 estudaram os efeitos dos campos elétricos moderados do AO na enzima PME e α -amilase. Estes autores concluíram que sob determinadas condições, o AO possibilita ativar estas enzimas (aumento da sua atividade enzimática) em vez de as inativar e, que este carácter ativador acontece a temperaturas mais baixas e é intensificado com o aumento da intensidade do campo elétrico.

De forma análoga à inativação enzimática, a ativação pode ocorrer devido a diversos fatores, não havendo uma justificação concreta para a ocorrência de tal fenómeno, uma vez que, como visto com estes dois últimos exemplos (Samaranayake & Sastry, 2016; Samaranayake & Sastry 2018), a atividade enzimática pode ser aumentada ou inibida pela manipulação da intensidade do campo elétrico, frequência e temperatura e, depende, igualmente, do tipo de enzima em estudo e da sensibilidade à variação destes parâmetros. Apesar destas variações, foram discutidas algumas teorias que visam justificar a possibilidade de aumento da atividade enzimática com aplicação de AO:

- As mudanças conformacionais da enzima podem melhorar, ou prejudicar, a sua funcionalidade, dependendo da frequência e intensidade do campo elétrico aplicado, bem como da temperatura, pH e força iônica. A estrutura terciária das enzimas é formada por interações não covalentes (como forças de van der Waals, ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas) e é responsável pela funcionalidade da enzima. No caso particular em que o AO tem a capacidade de provocar um aumento da atividade enzimática pode dever-

se à formação de uma nova conformação da enzima, que seja mais ativa melhorando a sua funcionalidade (Samaranayake & Sastry, 2018; Pereira, et al., 2011);

- O movimento eletroforético, resultante da aplicação de campos elétricos moderados, exerce um efeito de ativação ou inativação das moléculas de enzima (Samaranayake & Sastry, 2016b), dependendo da temperatura. Cálculos eletroforéticos sugerem que as enzimas se comportam como se estivessem a uma temperatura mais alta (do que a que realmente se encontram) na presença de um campo elétrico, o que justifica que a temperaturas mais baixas possa ocorrer ativação e a temperaturas mais altas inativação (Samaranayake & Sastry, 2016b);
- A ocorrência de reações paralelas como a eletrólise da água e a corrosão dos eletrodos podem originar componentes que interagem com as enzimas, provocando alterações conformacionais que beneficiam a atividade enzimática (Sakr & Liu 2014; Brochier, et al., 2019).
- A taxa da reação enzimática pode ser aumentada devido ao movimento eletroforético da enzima, provocado pelo campo elétrico oscilante. A aplicação de campo elétrico moderado terá a capacidade de melhorar a mobilidade da enzima na mistura de reação, aumentando a probabilidade de a enzima encontrar o substrato (Samaranayake & Sastry, 2018).

AO no mosto de Vinho Verde – o efeito na atividade da PEC

O AO apresenta uma nova visão no processamento e na preservação de alimentos, em alternativa aos processos convencionais. No que diz respeito à segurança dos alimentos, inocuidade dos produtos e características sensoriais desejáveis, esta tecnologia é promissora.

São necessárias mais pesquisas de forma a entender melhor o efeito que os campos elétricos provocam nos alimentos. Porém, o potencial de inativação térmico e não térmico que o AO apresenta, aliado à necessidade de descoberta de alternativas à conservação do mosto de Vinho Verde, evitando assim o uso de produtos químicos como é o caso do SO₂, fez com que surgisse a possibilidade de estudar a aplicação deste tratamento aos mostos de Vinho Verde a fim de perceber se os efeitos provocados serão benéficos para a qualidade do produto final.

Este tratamento irá afetar, de maneira diferente, os vários componentes do mosto de Vinho Verde – leveduras, bactérias, compostos do aroma, compostos do sabor, enzimas, assim como o tempo de conservação e estabilização, quer do mosto quer do vinho. Por esta razão é necessário estudar, isoladamente, o efeito do tratamento óhmico sobre estes componentes. O objetivo desta dissertação será

analisar o efeito que o AO provoca na enzima PEC, cuja presença no mosto de Vinho Verde, na etapa de clarificação, é muito importante.

A uva, fruto da videira, é, frequentemente, utilizada para produzir vinho, sumo, compotas, passas e pode ser consumida ao natural. A sua parede celular consiste em microfibrilas (estruturas formadas por micelas dispostas ordenadamente) de celulose ligadas entre si por uma matriz de xiloglucano, manano, xilano (hemicelulose) e pectina, as quais são estabilizadas por uma rede de proteínas (Claus & Mojsov, 2018). As pectinas são polissacarídeos solúveis de natureza coloidal, que podem apresentar diferentes graus de esterificação, afetando o seu grau de solubilidade (Santi, et al., 2014). Fisiologicamente, estes polímeros contribuem para a rigidez, resistência e textura das uvas durante o seu crescimento e amadurecimento (Santi, et al., 2014). No entanto, na produção de vinho, as PEC's podem ter um efeito negativo (Isle & Cellars, 1964). A alta viscosidade da pectina, libertada durante as fases de maceração da vinificação, impede a extração, clarificação e filtração do sumo (Claus & Mojsov, 2018). Para além disso a pectina, devido à sua elevada viscosidade, evita a difusão de compostos fenólicos e aromáticos no mosto durante a fermentação do vinho (Claus & Mojsov, 2018).

PEC é um nome genérico atribuído a uma família de enzimas envolvidas na degradação de substâncias pécticas, hidrolisando as ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbónica (Merín & Ambrosini, 2015; Uenojo & Pastore, 2007). Devido à grande diversidade de pectinas nas plantas e devido à sua complexidade são necessárias diferentes PEC's, com formas de ação distintas, para que seja possível clivar esta molécula complexa em pequenos fragmentos – Poligalacturonase (PG); Pectinesterase (PE), Pectinliase (PL) e Pectatoliase (PAL) (Santi, et al., 2014; Claus, & Mojsov, 2018). A PG, PL e PAL são consideradas enzimas despolimerizantes pois clivam a molécula de pectina entre os monómeros de ácido galacturónico. APE catalisa a desesterificação dos grupos metoxil da pectina (Santi, et al., 2014).

As enzimas pectinolíticas podem ser produzidas através de uma vasta variedade de microrganismos – bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, insetos e nematoides (Santi, et al., 2014; Merín, et al., 2014). Devido à fácil produção e à diversidade de PEC's obtidas através de fontes fúngicas, a maioria das preparações comerciais, em escala industrial, são produzidas através de fungos filamentosos, sendo o mais usado o fungo *Aspergillus niger* (Santi, et al., 2014; Claus & Mojsov, 2018). Este fungo é utilizado para a produção industrial pois é classificado como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) - órgão americano responsável pelo controlo de alimentos e medicamentos (Claus & Mojsov, 2018).

As PEC's são amplamente usadas na indústria de vinhos com os principais objetivos de clivar a pectina, melhorando, assim, a liquefação e a clarificação o mosto e do vinho e facilitar a filtração (Merín, et al., 2011; Merín, et al., 2015). Para além disto, estas enzimas possibilitam uma extração aprimorada de compostos de cor e sabor das películas das uvas, facilitando, igualmente, a libertação de compostos fenólicos (Merín & Ambrosini, 2015; Belda, et al., 2016).

As enzimas pécticas, a fim de clivar as pectinas e permitir a redução da viscosidade e uma maior libertação de compostos da película da uva, devem ser adicionadas antes da fermentação, de preferência no momento da trituração das uvas (Isle & Cellars, 1964). Idealmente estas enzimas devem ser, também, adicionadas a temperaturas de pelo menos 27 °C para serem mais eficazes (Isle & Cellars, 1964; Merín & Ambrosini, 2015). A adição das PEC's a temperaturas inferiores (por volta dos 12 °C) também é conveniente, uma vez que as baixas temperaturas favorecem a conservação das características sensoriais no produto final, porém fará com que estas enzimas demorem mais tempo a reagir (Merín & Ambrosini, 2015).

O AO, dependendo das condições seleccionadas e do alvo, pode apresentar um carácter diferenciador na atividade das enzimas pectinolíticas. No caso do mosto de Vinho Verde, é importante que o AO inative microrganismos e enzimas que sejam prejudiciais à sua conservação e que afetem a qualidade final do Vinho Verde. Porém, no caso concreto das enzimas pectinolíticas, que têm um papel importante no mosto do Vinho Verde, seria mais vantajoso que o AO possibilitasse um aumento da atividade enzimática à imagem do que alguns estudos prévios já indicam noutras matrizes. Sendo o AO uma tecnologia cujo efeito de inativação é maioritariamente térmico, até à data não existem estudos acerca da influência de parâmetros elétricos na atividade enzimática da enzima PEC a temperaturas inferiores a 25 °C.

3. METODOLOGIAS

Este capítulo encontra-se dividido em seis secções: secção 3.1 – metodologias empregues na caracterização física e química do vinho; secção 3.2 – metodologias de determinação da atividade enzimática; secção 3.3 – ensaios enzimáticos realizados pelo AC; secção 3.4 – ensaios enzimáticos realizados pelo AO; secção 3.5 – metodologia de quantificação de pectina do mosto de Vinho Verde e secção 3.6 – análise estatística.

3.1 Caracterização física e química do vinho

As principais análises realizadas ao vinho permitiram determinar a sua percentagem de álcool, o seu pH, a sua acidez volátil, a sua acidez total, o seu SO₂ livre e o seu SO₂ total.

3.1.1 Determinação da percentagem de álcool

Na determinação da percentagem de álcool foi utilizado um ebuliómetro (Gabsystem, Espanha) e uma régua de conversão de temperatura, em graus Celsius, para percentagem de álcool, seguindo a metodologia indicada no manual de instruções do equipamento, fornecido pela GABsystem.

Para este método, foi efetuada uma calibração do equipamento, que consistiu na colocação de água destilada até ao nível indicado, ligar e deixar ferver até que fosse atingida uma temperatura constante (aproximadamente 7 min). De seguida, o equipamento foi desligado e a água escoada. Após o arrefecimento do ebuliómetro, esta operação foi repetida até que fossem obtidas três medições de temperatura iguais. Essa temperatura foi registada e usada como referência na régua de conversão.

A amostra, para a qual se pretende determinar a percentagem de álcool, foi colocada no ebuliómetro até ao nível indicado, sendo este posteriormente ligado. A amostra foi deixada a ferver até que fosse possível registar um valor constante de temperatura (aproximadamente 7 min). De forma semelhante à calibração, esta operação foi repetida até que fossem registadas três temperaturas iguais.

Com a temperatura de calibração e com a temperatura da amostra foi determinada a percentagem de álcool do vinho, usando a régua de calibração.

3.1.2 Determinação do pH

O pH das amostras foi medido recorrendo a um potenciómetro digital (Anadil, Portugal) equipado com um elétrodo de vidro, sendo este calibrado, diariamente, antes das medições das amostras, utilizando três soluções padrão de pH 4; 7 e 9.

3.1.3 Determinação da acidez volátil

A acidez volátil foi determinada através da destilação a vapor do vinho e respetiva titulação, com hidróxido de sódio 0,1 mol/L e indicador de fenolftaleína, do destilado, seguindo a metodologia indicada no manual de instruções do equipamento, fornecido pela Anadil. A destilação foi realizada num acidímetro (Anadil, Portugal), no qual foi colocado 10 mL de vinho, livre de dióxido de carbono. O processo de destilação termina quando se recolhem 100 mL de destilado num Erlenmeyer.

Ao destilado foi adicionado 5 gotas de fenolftaleína, e esta mistura foi titulada com hidróxido de sódio 0,1 mol/L até ser obtido uma coloração rosa persistente, registando-se o volume utilizado. A acidez volátil (AV) (g de ácido acético/L) foi obtida através da seguinte equação:

$$AV = \text{Volume (mL de hidróxido de sódio usado)} \times 0,6 - \text{fator de correção} \quad \text{Equação 6}$$

$$\text{Fator de correção} = (\text{SO}_2 \text{ livre (mg/L)} / 32) \times 0,1 \quad \text{Equação 7}$$

3.1.4 Determinação da acidez total

A acidez total do vinho corresponde à soma da acidez volátil e da acidez fixa. O seu valor foi determinado através de uma titulação com hidróxido de sódio 0,1 mol/L e com o indicador de azul de bromotimol (Regulamento (CEE) n.º 2676/90 de 17 de setembro de 1990).

Num Erlenmeyer foi colocado 30 mL de água destilada, 1 mL de solução de azul de bromotimol e 10 mL de vinho livre de dióxido de carbono. Esta solução foi titulada com hidróxido de sódio 0,1 mol/L até se obter uma cor azul esverdeada, registando-se o volume utilizado.

A acidez total (AT) (g de ácido tartárico/L) foi obtida através da seguinte equação:

$$AT = \text{Volume (mL de hidróxido de sódio usado)} \times 0,75 \quad \text{Equação 8}$$

3.1.5 Determinação do SO₂ livre

O SO₂ livre foi determinado por titulação iodimétrica de uma solução contendo 20 mL de vinho, livre de dióxido de carbono, e 1 mL de ácido sulfúrico a 1/3, seguindo a metodologia indicada no manual de instruções do equipamento, fornecido pela Anadil).

Esta titulação foi realizada num equipamento automático, Eno 20 Eco/plus (Anadil, Portugal), que lê o pH e pára assim que se tenha atingido o valor correto.

O SO₂ livre (mg/L) foi obtido por leitura direta na bureta.

3.1.6 Determinação do SO₂ total

O SO₂ total foi obtido por titulação iodimétrica após a realização de uma hidrólise alcalina - num gobelet foi colocado 20 mL de vinho e 4 mL de hidróxido de sódio 5 mol/L, deixando a reagir durante 10 minutos. No fim deste tempo foi adicionado 2 mL de ácido sulfúrico a 1/3 e foi realizada a titulação com iodo, num equipamento automático, Eno 20 Eco/plus (Anadil, Portugal), que lê o pH e pára assim que se tenha atingido o valor correto (Manual de instruções do equipamento, fornecido pela Anadil).

O SO₂ total (mg/L) foi obtido por leitura direta na bureta.

3.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da PEC pode ser determinada através de dois métodos, a saber o método com 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) (Pereira, et al., 2012; Oumer & Abate, 2018) e o método com o reagente ciano acetamida (Honda, et al., 1982; Jacob, et al., 2008), que permitem determinar a degradação enzimática de polissacarídeos.

3.2.1 Método de DNS

Para a realização deste método foi necessário preparar, previamente, algumas soluções:

- Solução de DNS (Pereira, et al., 2012)

Para a obtenção de uma solução de 100 mL de DNS foi necessário 20 mL de uma solução de hidróxido de sódio 2 mol/L, 1 g de ácido 3,5 – Dinitrosalicílico (previamente dissolvido em 25 mL de água a 80 °C) e 30 g de tartarato de sódio.

- Tampão citrato: 0,05 mol/L, pH 3,5 (Works, 2018)
- Substrato: 2,5 g/L de pectina em tampão citrato (Merín, et al., 2015)
- Amostra de enzima: 10 g/L de PEC em tampão citrato

A PEC usada é a *Bioenzym W Compact Liquid*. É uma enzima usada nos processos de vinificação, totalmente purificada e apresenta a maior concentração do mercado. Esta enzima tem a capacidade de hidrolisar a pectina solúvel e coloidal dos mostos de Vinho Verde, produzindo uma despectinização fulminante do mosto e uma ótima clarificação, potenciando a expressão aromática dos vinhos (BioEno. 2013). De forma a poder usar esta enzima em ensaios laboratoriais, foi necessário diluí-la em tampão citrato.

Para a realização da curva de calibração deste método foi preparada uma solução aquosa de ácido galacturónico concentrada (2 g/L), a partir da qual foram feitas oito soluções diluídas (0,15 g/L a 1 g/L) (Pereira, et al., 2012). Estas soluções foram analisadas seguindo a metodologia de DNS - foi usada uma proporção de 1:1 de amostra de cada concentração (0,5 mL) e reagente de DNS (0,5 mL). Os tubos de ensaio foram colocados em banho maria a 100 °C durante 5 minutos. Após este tempo foi adicionado 5 mL de água destilada a cada tubo. A leitura das absorbâncias foi realizada a 540 nm através de um leitor de placas de ELISA (Thermofisher Scientific, Portugal), com a quantidade de solução de 0,2 mL em cada poço, de acordo com o descrito em literatura (Pereira, R.N., Martins, R.C., & Vicente, A. A. 2012). A análise foi realizada em triplicado. Ao longo do tempo de trabalho laboratorial foi necessário preparar quatro soluções de DNS, cada uma com a respetiva calibração (Anexo F), cujos coeficientes de correlação (R^2) obtidos foram os seguintes: 0,9941; 0,9985; 0,9951; 0,9958.

Para a análise da atividade enzimática foi de igual modo utilizada a proporção de 1:1 de amostra e reagente de DNS, mas neste caso foi retirada 0,1 mL de amostra (substrato – pectina em tampão citrato – e enzima PEC) e colocada, imediatamente, num eppendorf de 1,5 mL, onde foi colocado, previamente, 0,1 mL de DNS (Oumer & Abate, 2018). O eppendorf, com a amostra e com o DNS foi imediatamente, agitado e, posteriormente, colocado num banho a 100 °C durante 5 minutos. Após este tempo foi adicionado 1 mL de água destilada. Por fim colocou-se 0,2 mL de cada amostra numa placa elisa e procedeu-se com a leitura de absorbância a 540 nm como descrito anteriormente.

Na Figura 8, encontra-se uma placa elisa de 96 poços, onde foram colocadas amostras para posterior análise das suas absorbâncias com um espetro de luz visível.

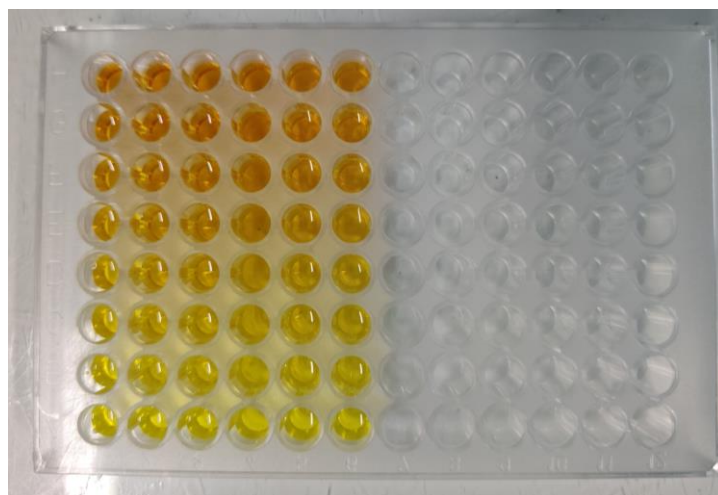


Figura 8: Placa elisa – calibração de ácido galacturónico na gama de concentrações compreendida entre 0 g/L e 1 g/L pelo método de DNS.

Nesta figura é notório um crescente escurecimento da coloração das amostras, correspondente a um respetivo aumento da concentração de ácido galacturónico

3.2.2 Método da ciano acetamida

Para a realização deste método foi necessário preparar, previamente, algumas soluções:

- Tampão citrato: 0,05 mol/L, pH 3,5 (Works, 2018)
- Tampão borato: 0,1 mol/L, pH 9,0 (Works, 2018)
- Solução aquosa de 2 – ciano acetamida 1 % (Honda, et al., 1982; Jacob, et al., 2008)
- Substrato: 2,5 g/L de pectina em tampão citrato (Merin, et al., 2015)
- Amostra de enzima: 10 g/L de PEC em tampão citrato

Para a realização da curva de calibração deste método foi preparada uma solução aquosa de ácido galacturónico concentrada (0,3 g/L), a partir da qual foram feitas cinco soluções diluídas (0,00097 g/L a 0,08097 g/L) (Jacob, et al., 2008). Estas soluções foram analisadas seguindo a metodologia de ciano acetamida – 1 mL de amostra de cada concentração, 1 mL da solução aquosa de ciano acetamida e 2 mL de tampão borato. Os tubos de ensaio foram colocados num banho maria a 100 °C durante 5 minutos. Após este tempo foram transferidos para um banho de gelo durante 30 segundos. A leitura das absorbâncias foi realizada a 274 nm através de um leitor de placas de ELISA (Thermofisher Scientific, Portugal) com a quantidade de solução de 0,3 mL em cada poço de uma placa de quartzo (microplaca UV), de acordo com o descrito em literatura (Jacob, et al., 2008). A análise foi realizada em triplicado. Ao longo do tempo de trabalho laboratorial foi necessário preparar duas vezes os reagentes requeridos por esta metodologia, tendo sido obtido duas curvas de calibração (Anexo G), cujos coeficientes de correlação (R^2) obtidos foram os seguintes: 0,9931 e 0,9980.

Para a análise da atividade enzimática foi retirado 0,3 mL de amostra (substrato – pectina em tampão citrato – e enzima PEC) e colocada, imediatamente, num eppendorf de 1,5 mL, onde foi colocado, previamente, 0,3 mL de solução aquosa de ciano acetamida e 0,6 mL de tampão borato. O eppendorf, com a amostra e com os reagentes deve ser logo agitado e, posteriormente, colocado num banho a 100 °C durante 5 minutos. Após este tempo os eppendorfs foram colocados em gelo durante 30 segundos (Bach, E., & Schollmeyer, E. 1992). Por fim colocou-se 0,3 mL de cada eppendorf numa placa de poços de quartzo (microplaca UV) e foi lida a absorbância a 274 nm.

3.3 Ensaio enzimáticos pelo AC

Os ensaios enzimáticos pelo método convencional, foram realizados através de três reatores com camisa e agitação, ligados em série (o que permitiu a realização da reação enzimática em triplicado) a um banho com controlo de temperatura

A instalação experimental está representada na Figura 9.

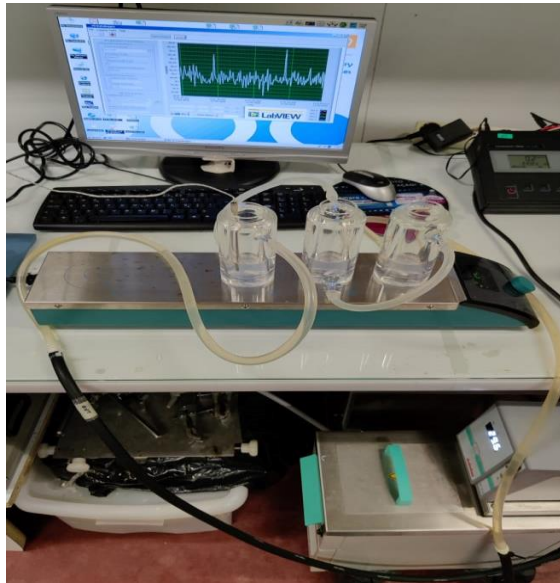


Figura 9: Esquema da instalação experimental do AC.

Foi utilizado um termopar do tipo K (Omega 709) com o objetivo de assegurar que a temperatura do banho fosse igual à temperatura da solução, dentro de cada reator. Com esta instalação foi possível garantir que os três reatores se encontram à mesma temperatura e sob a mesma agitação durante os ensaios experimentais.

Dentro de cada reator foi colocado um volume total de 20 mL. Começou-se por colocar o substrato - pectina em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 - ao qual foi adicionada a solução de 10 g/L de enzima em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5, de forma a garantir uma concentração de 0,3 g/L (Oumer & Abate, 2018). Para validação dos resultados, este substrato foi posteriormente substituído por mosto de Vinho Verde.

De forma a acompanhar a cinética da reação enzimática foram retiradas amostras de 0,1 mL em diferentes tempos (no tempo 0 – momento em que é adicionada a enzima e, posteriormente, ao fim de 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min e 25 min) e aplicado, imediatamente, a metodologia de DNS de acordo com o descrito anteriormente na secção 3.2.1 (Oumer & Abate, 2018). Esta metodologia

também foi aplicada ao branco do ensaio, correspondente a uma amostra de 0,1 mL de substrato. No caso da aplicação da metodologia da ciano acetamida foram retiradas amostras de 0,3 mL diferentes tempos (no tempo 0 – momento em que é adicionada a enzima e, posteriormente, ao fim de 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min e 25 min) (Bach & Schollmeyer, 1992) procedendo-se de acordo a metodologia descrita na secção 3.2.2. Nesta metodologia foi igualmente utilizado um branco do ensaio correspondente a uma amostra de 0,3 mL de substrato.

3.4 Ensaios enzimáticos pelo AO

Os ensaios enzimáticos, pelo método do AO, consistiram na utilização de um reator tubular com camisa de arrefecimento colocado sob uma placa de agitação. De forma análoga, os ensaios pelo AO foram realizados sempre em triplicado. A instalação experimental está representada na Figura 10.

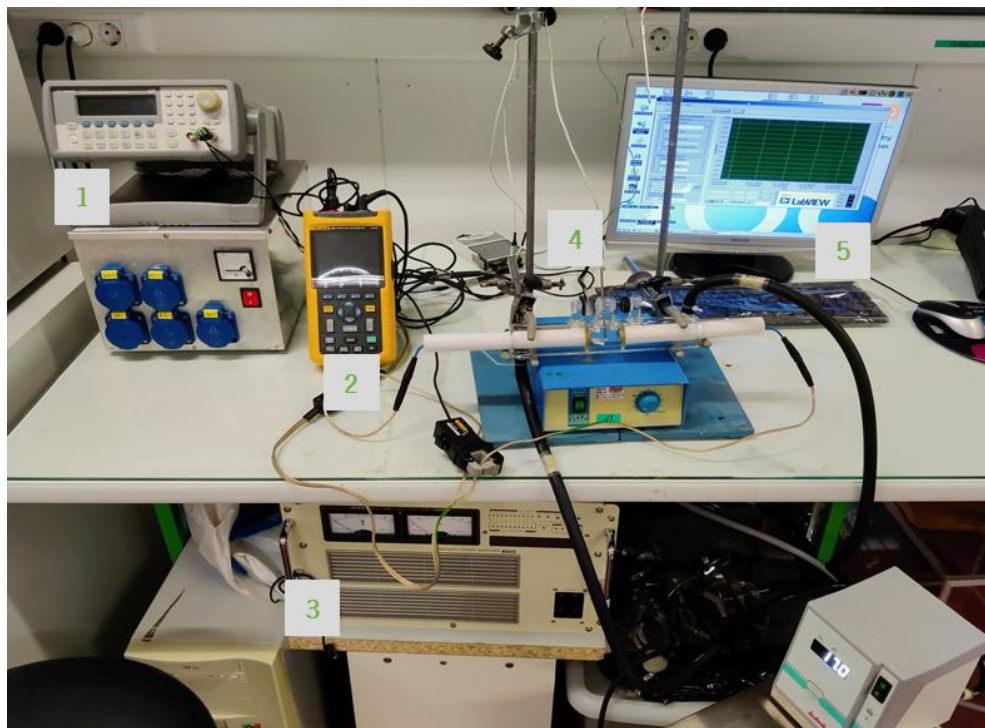


Figura 10: Esquema da instalação experimental do AO.

O reator tubular possibilita a colocação de dois elérodos de aço inox, um em cada uma das extremidades do reator, a uma distância de 3,5 cm, que corresponde a um volume disponível de 20 mL.

Na Figura 10, em 1 encontra-se um gerador de sinal (1 Hz – 25 MHz e 1 – 10 V; Agilent 33220 A, Penang, Malásia), que permite selecionar o tipo de onda a aplicar à amostra a ser colocada no reator,

assim como a sua frequência e voltagem, e em 2 um voltímetro (Fluke 125, EUA) usado para medir a intensidade da corrente aplicada. Foi, também, usado um amplificador de sinal, em 3, de forma a aumentar a voltagem aplicada. Neste trabalho, por motivos externos, foram usados dois amplificadores diferentes, o primeiro (Peavey CS3000, Meridian, MS, EUA), que tinha um alcance máximo de frequência de 25 kHz, ampliava o sinal 50 vezes, e o segundo (Precision Power Amplifier 4505, NF Corporation, Japão), que apesar de ter um alcance máximo de frequência de apenas 20 kHz, amplificava o sinal 66 vezes. Para todos os ensaios foram recolhidos os perfis de temperatura ao longo do tempo, recorrendo a um termopar do tipo K (Omega 709) (ponto 4), e registados usando um data logger (National Instruments, USB – 9161), encontrado em 5. Dentro do reator óhmico foram colocados 20 mL, de substrato - pectina em tampão citrato - e solução de enzima em tampão citrato, de forma a garantir uma concentração de 0,3 g/L (Oumer & Abate, 2018). Tal como no AC, para validação dos resultados este substrato foi substituído por mosto de Vinho Verde.

Para avaliar a influência dos parâmetros elétricos em combinação com a temperatura na atividade da PEC, foram realizados vários tratamentos combinando diferentes condições de acordo com a Tabela 4.

O seguimento da atividade enzimática foi realizado de forma idêntica à descrita no ensaio pelo AC, na secção 3.3.

Tabela 4: Condições de temperatura, frequência e campo elétrico testadas no AO

Parâmetros	Valores
Matriz sintética: Varição da Temperatura Frequência constante = 25000 Hz Campo elétrico constante de aproximadamente 7 V/cm	15 °C
	20 °C
	25 °C
	30 °C
	35 °C
Matriz sintética: Varição da Frequência Temperatura constante = 20 °C Campo elétrico constante de aproximadamente 7 V/cm	50 Hz
	100 Hz
	500 Hz
	2000 Hz
	25000 Hz

Matriz sintética: Variação da Frequência Temperatura constante = 30 °C Campo elétrico constante de aproximadamente 7 V/cm	50 Hz
	100 Hz
	500 Hz
	2000 Hz
	25000 Hz
Matriz sintética: Variação do Campo elétrico Temperatura constante = 20 °C Frequência constante = 2000 Hz	0 V/cm
	0,2 V/cm
	2 V/cm
	7 V/cm
	14 V/cm
Matriz sintética: Variação do Campo elétrico Temperatura constante = 30 °C Frequência constante = 100 Hz	0 V/cm
	0,2 V/cm
	2 V/cm
	7 V/cm
	14 V/cm
Matriz sintética: Validação do método de análise da atividade enzimática	20 °C + 2000 Hz + 7 V/cm
Mosto de Vinho Verde	20 °C + 2000 Hz + 7 V/cm

3.5 Quantificação de pectina no mosto de Vinho Verde

A pectina é um polissacarídeo que existe, naturalmente, na parede celular das uvas. No mosto do vinho, a concentração de pectina varia com o tipo de casta de uvas, o grau de maturação e o método de extração, encontrando-se entre 0,5 g/L e 3,0 g/L (Rizzon, 2007). Perante este carácter variável, tornou-se necessário quantificar a pectina no mosto que foi usado nos ensaios deste trabalho. Foi realizada uma quantificação gravimétrica, após a precipitação da pectina do mosto, utilizando uma solução de álcool acidificado de acordo com método de identificação de pectina usado pela Novozymes. Para isso é necessário preparar uma solução de álcool acidificado composta por 99 % de etanol a 96 % e 1 % de ácido clorídrico puro a 35 % (Novozymes,s.d.). Para a precipitação da pectina realizou-se a mistura do mosto (4 mL) com a solução de álcool acidificado (8 mL) , e ,após leve agitação, deixou-se em repouso durante 5 minutos – Figura 11 (Novozymes,s.d.).

Para quantificar a pectina precipitada, procedeu-se à uma centrifugação a 1960 *g* durante 5 min. O pellet resultante foi colocado a secar a 50 °C durante 24 h. Depois de seca foi determinada a massa de pectina obtida (Grassino, et al., 2018). A Figura 11 ilustra, igualmente, a formação de pellet de pectina após precipitação e centrifugação e posterior secagem.

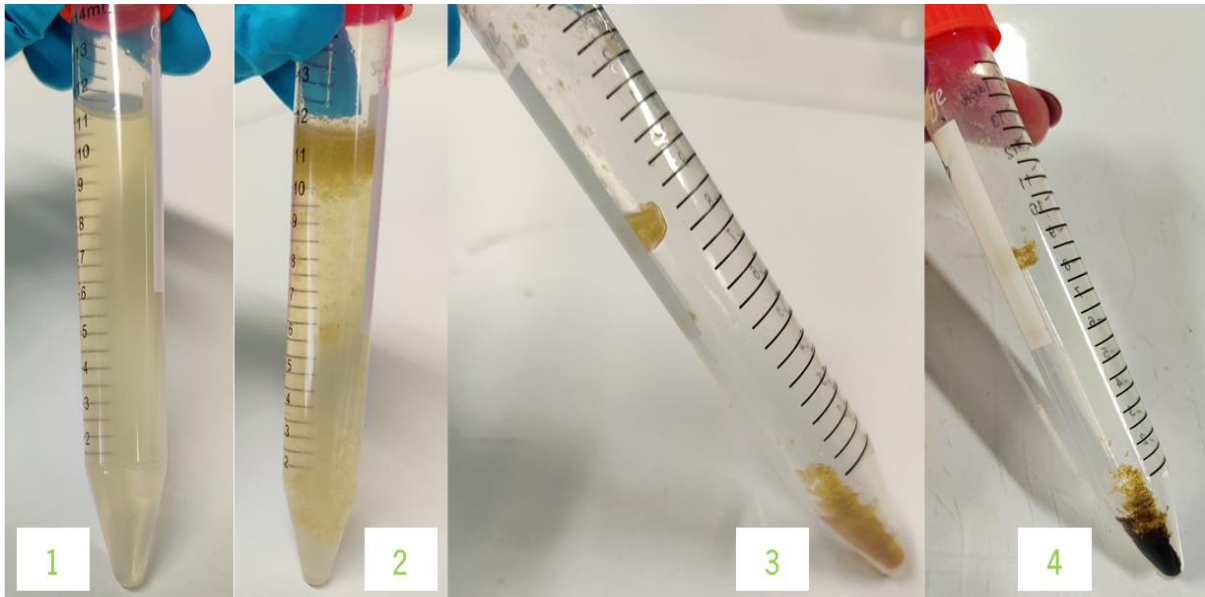


Figura 11: (1) Mistura de mosto com solução de álcool acidificado; (2) Precipitação da pectina do mosto; (3) Pectina obtida após centrifugação; (4) Pectina seca.

3.6 Análise estatística

O Excel foi utilizado para tratar os dados obtidos ao longo deste trabalho e para a construção dos gráficos. Para cada condição (do AO e do AC) estudada foram realizadas três réplicas. Para se determinar se havia diferença significativa entre a atividade enzimática obtida pelo AO e o seu controlo, efetuado pelo AC, foi realizado o teste de T-student com um nível de significância de 5%. Para a realização deste teste foi necessário, inicialmente, determinar se os dados, a ser comparados, possuíam variância igual ou diferente através do Teste F.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização

O processo de vinificação está, ainda, bastante atrasado tecnologicamente e, de forma análoga, as preparações enzimáticas, usadas na produção de vinho, são pouco explicitadas. Estas preparações enzimáticas são frequentemente descritas como “cocktails multi-atividades”, contemplando a junção de diversas enzimas com várias funções específicas, o que dificulta o estabelecimento dos parâmetros ótimos de utilização (Schaff, et al., 2017).

A enzima pectinolítica usada nos testes efetuados no âmbito deste trabalho é específica para uso na área dos vinhos, tendo como nome *Bioenzym W Compact Liquid*. Devido à falta de dados referentes aos parâmetros ótimos de utilização deste tipo de enzima, como a temperatura e concentração, foi necessário otimizar as suas condições de utilização antes de proceder aos tratamentos enzimáticos, com o AO.

Com base nas condições ótimas de atividade enzimática dos tipos de PEC conhecidas foram realizadas três otimizações - otimização do método de medição da atividade enzimática, otimização do substrato (concentração e pH) e otimização da temperatura de reação.

4.1.1 Otimização do método de medição da atividade enzimática

A medição da atividade enzimática é uma avaliação da atividade catalítica de uma enzima (Haida & Hakiman, 2019). Para medição da atividade catalítica, é necessário considerar vários fatores – tipo de enzima, pH, temperatura, substrato e produto resultante da transformação do substrato pela enzima (Bisswange, 2014; Creative Enzymes, 2011). Por esta razão, os protocolos de determinação de atividade enzimática existentes não podem ser descritos detalhadamente, sendo a sua otimização um passo fundamental.

A primeira etapa na seleção do método consistiu em selecionar o tipo de ensaio a realizar – um ensaio contínuo exige uma monitorização contínua do consumo do substrato e formação do produto; um ensaio descontínuo requer uma interrupção da reação enzimática em diferentes momentos e uma posterior quantificação do produto formado (Harris & Keshwani, 2009; Scopes, 2002). Foi escolhido um método descontínuo, uma vez que se pretendia fazer o seguimento da reação enzimática durante o tratamento óhmico e convencional, quantificando o produto formado, apenas, em alguns momentos da reação. Os métodos espectrofotométricos, que consistem na emissão de um espectro de luz entre os 100 nm e os 1100 nm e registo da luz que é absorvida ou dispersa pela solução de reação, são os mais

usados em ensaios descontínuos, uma vez que são os mais fáceis de manusear e os mais baratos (Haida & Hakiman, 2019; Creative Enzymes, 2011).

Para a monitorização da atividade enzimática da PEC foram considerados dois métodos descontínuos com posterior análise espectrofotométrica. O primeiro consiste em interromper a reação enzimática através da adição do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) e quantificar os açúcares redutores resultantes (grupo carbonilo livre - CO) através da medição da absorbância a 540 nm (Oumer & Abate, 2018). O segundo método também permite determinar a degradação enzimática de polissacarídeos, e consiste em interromper a reação enzimática em momentos diferentes com a adição de dois reagentes - tampão borato (0,1 mol/L, pH 9,0) e ciano acetamida a 1 %, com posterior medição da absorbância a 274 nm (Jacob, et al., 2008; Castro, et al., 2006).

Após a seleção dos métodos, houve a necessidade de otimizar as quantidades de amostragem e reagentes a ser usados. O volume reacional total (substrato e enzima) foi estabelecido como sendo de 20 mL. Dada a necessidade de retirar no mínimo cinco amostras em diferentes intervalos de tempo, de forma a poder analisar a fase linear da atividade enzimática, os volumes amostrais propostos pelos protocolos eram demasiado elevados, face ao volume reacional, e, por isso, tiveram de ser adaptados. Com esta otimização foi possível retirar amostras de 0,1 mL e 0,3 mL no caso da análise pelo método de DNS e da ciano acetamida, respetivamente.

Foi, igualmente, necessário eleger um dos métodos considerado o mais proficiente, ou seja, o mais fácil, rápido e prático de usar, e que permitisse um melhor acompanhamento da velocidade inicial da reação enzimática. Para isso, os dois testes foram usados para analisar a atividade da enzima PEC na mesma mistura reacional. O método de DNS foi escolhido como método de análise principal, dada a sua praticidade face ao método da ciano acetamida, e ao facto de ter permitido obter um gráfico da atividade enzimática com a fase linear mais bem definida, conforme ilustrado nas Figuras A1 e A2 do anexo. Apesar desta seleção, o método da ciano acetamida não foi completamente excluído. Ficou estabelecido que, numa fase mais avançada dos tratamentos realizados com o AO, os dois métodos seriam usados para medir a atividade enzimática da melhor condição encontrada, com o intuito de validar os resultados obtidos com o método de DNS.

4.1.2 Otimização do substrato e temperatura

Nos primeiros testes de otimização, as condições usadas tiveram como referência os tipos de PEC conhecidas. Para a otimização de substrato, a temperatura usada para a realização dos testes foi

de 38 °C, pois a temperatura ótima da maioria das estirpes de PEC registadas situa-se entre os 38 °C e os 40 °C (Dhembare, et al., 2015; Sudeep, et al., 2020; Nsude, 2014).

O substrato de interesse para os testes enzimáticos é o mosto de Vinho Verde, porém os testes preliminares foram realizados numa solução de pectina de concentração conhecida. A primeira etapa a ser realizada na otimização do substrato foi a escolha do tampão, no qual a pectina seria dissolvida, e consequentemente definição do pH do meio reacional. O tampão recomendado no protocolo de análise com o método de DNS (Oumer & Abate, 2018) é normalmente o tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,5 (Works, 2018). Porém, visto que o mosto de Vinho Verde apresenta um pH ácido, foi, igualmente, usado o tampão citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 (Works, 2018), a fim de perceber qual deles permitia a obtenção de melhor atividade enzimática. O tampão escolhido foi o tampão citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 pois, conforme ilustrado nas Figuras B1 a B4 do anexo B, foi o que apresentou melhor perfil de atividade enzimática ao longo do tempo e o que permitiu obter maior valor de atividade enzimática, com a melhor correlação na fase linear. Por outro lado, através deste tampão foi possível simular o pH do mosto de Vinho Verde.

A concentração real de pectina no mosto de Vinho Verde é variável com o tipo de casta e condições da vindima. Por esta razão, foi necessário otimizar a concentração de pectina dissolvida em tampão citrato. Foram selecionadas quatro concentrações: 5 g/L; 15 g/L; 25 g/L e 30 g/L. A concentração de 30 g/L não foi testada, devido a aumento da viscosidade observado para concentrações mais elevadas e problemas de dissolução. Por outro lado, as concentrações de 15 g/L e de 25 g/L provocaram inibição enzimática. Nesse sentido, a única concentração que possibilitou a realização da reação enzimática foi a de 5 g/L, conforme registado nas Figuras B5 a B7 do anexo B.

Com estas otimizações foi possível concluir que os melhores valores de atividade enzimática foram alcançados com uma solução de pectina 5 g/L dissolvida em tampão citrato 0,1 mol/L, pH 3,5.

Para a otimização da temperatura, inicialmente foram testadas as temperaturas de 38 °C e de 30 °C. Os valores de atividade enzimática obtidos nos dois casos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Por esta razão foi realizada uma análise de reprodutibilidade da atividade enzimática em cada um dos casos – analisar, em triplicado, a atividade enzimática da PEC a 30 °C e a 38 °C. Como os valores não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, nenhuma destas temperaturas foi escolhida como a ideal.

Merín, et al., 2015 fizeram uma caracterização da atividade da enzima PEC a partir de leveduras da uva bonarda argentina para usos enológicos. Foi usada uma solução de pectina 2,5 g/L dissolvida em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 e a reação foi realizada á temperatura de 27 °C e 12 °C. Estas duas condições foram estudadas (Figura B8 e B9 do anexo B). Foi notório que estes dois cenários

permitiram a obtenção de resultados de atividade enzimática com uma melhor definição da fase linear característica dos instantes iniciais da reação enzimática e com um bom coeficiente de correlação (0,9752 e 0,9802, respetivamente para a temperatura de 27 °C e 12 °C).

Com o objetivo final de eleger a condição ótima, ou seja, a condição que permite obter um valor de atividade mais elevado e reproduzível, foram realizados dois testes de reprodutibilidade, para cada condição de temperatura. De acordo com o descrito na metodologia (secção 3.3) foram utilizados três reatores encamisados ligados em série e a um banho, nos quais foi colocado o mesmo substrato. A condição eleita como ideal, com melhor reprodutibilidade e valor absoluto de atividade enzimática (Figura B10 e B11 do anexo B) englobaram a utilização do tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5, pectina 2,5 g/L e a temperatura de 27 °C.

4.2 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica traduz a capacidade de um material conduzir a corrente elétrica através de uma unidade de área por unidade de tempo, apresentando um gradiente potencial (Gavahian, et al., 2019; Müller, et al., 2020). É expressa em Siemens por metro (S/m) e traduzida pela seguinte equação (Dar, et al., 2020):

$$\sigma = \frac{L}{A} \times \frac{I}{V} \quad \text{Equação 9}$$

Nesta equação, L é a distância entre os eletrodos (m), I é a corrente elétrica alternada (A), A é a área da seção transversal perpendicular à passagem da corrente elétrica (m²) e V é a tensão aplicada (V). A condutividade elétrica é um parâmetro crucial no AO, uma vez que apenas os materiais que possuem valores entre 0,01 e 10 S/m a 25 °C podem ser facilmente processados através desta tecnologia (Sakr & Liu, 2014; Müller, et al., 2020). Quando esta tecnologia é usada para o processamento alimentar, a condutividade elétrica dos materiais alimentares é dividida em três grupos (Dar, et al., 2020):

- $\sigma > 0,05$ S/m: alimentos de boa condutividade: ovos, sumos de frutas, condimentos, sobremesas lácteas, vinho, hidrocolóides;
- $0,005 < \sigma < 0,05$ S/m: alimentos de baixa condutividade, que requerem maior intensidade de campo elétrico: margarina, marmelada;
- $\sigma < 0,005$ S/m: alimentos de baixa condutividade, que requerem força de campo

elétrico muito alta e são mais difíceis de processar por AO: licor, gordura.

Antes de iniciar os tratamentos da PEC vínica com o AO, com o auxílio de um condutivímetro, a condutividade elétrica do substrato (pectina 2,5 g/L em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5) e, posteriormente, do mosto de Vinho Verde, foi medida, de forma a averiguar se detinham valores dentro da gama recomendada para o uso do AO. À temperatura de 25,2 °C a condutividade elétrica da amostra de substrato (tampão citrato e pectina) foi de 0,257 S/m. Esta matriz alimentar, que visa simular o mosto de Vinho Verde, representa um alimento com boa condutividade ($\sigma > 0,05$ S/m) (Dar, et al., 2020) e pode ser utilizada no processamento pelo AO, uma vez que este valor, a 25 °C, se encontra entre 0,01 S/m e 10 S/m (Sakr & Liu, 2014; Müller, et al., 2020). Para além disso, segundo Sakr & Liu, 2014, o valor de condutividade elétrica de 0,257 S/m está dentro da faixa de valores que caracteriza os sumos de frutas – $0,05 < \sigma < 1,2$ S/m.

À temperatura de 24,9 °C a condutividade elétrica do mosto foi de 0,225 S/m. Apesar deste valor ser ligeiramente diferente da matriz sintética usada, respeita os mesmos critérios. O mosto apresenta uma boa condutividade e pode ser utilizado no processamento pelo AO (Dar, et al., 2020; Sakr & Liu, 2014; Müller, et al., 2020).

4.3 Tratamentos pelo AO

O AO é uma potencial tecnologia de processamento de alimentos, porém os efeitos resultantes deste tratamento dependem da forma como os constituintes dos alimentos reagem (Makroo, et al., 2020). Em princípio, toda a matéria, que seja constituída por partículas subatômicas eletricamente carregadas, como iões livres, deve responder individualmente a um campo elétrico imposto externamente, segundo a física (Samaranayake & Sastry, 2016). As enzimas quando colocadas em ambiente aquoso, dever-se-ão mover em resposta a um campo elétrico externo, provocado pelo AO (Samaranayake & Sastry, 2016; Kostelac, et al., 2020). Apesar das enzimas, devido às suas características elétricas, terem a capacidade de reagir a um campo elétrico, o mecanismo responsável pelo tipo de resposta - ativação ou inativação da sua atividade enzimática, ainda não é completamente conhecido (Zhang, et al., 2018 e Kostelac, et al., 2020). As informações relacionadas com os efeitos térmicos e não térmicos dos campos elétricos moderados do AO nas enzimas alimentares são raras e muitas vezes contraditórias, uma vez que o tipo de resposta depende do tipo de enzima usada, da preparação do substrato e das condições elétricas e térmicas impostas (Samaranayake & Sastry, 2016;

Makroo, et al., 2020). Portanto, o objetivo da utilização do AO neste trabalho foi investigar o efeito da temperatura, da frequência e do campo elétrico na PEC vínica.

4.3.1 Efeito da temperatura

A temperatura é um parâmetro essencial na atividade enzimática. Cada enzima tem uma temperatura ótima de atuação, na qual apresentam maior atividade. À medida que a temperatura se eleva até à ótima, a atividade enzimática tende a aumentar, uma vez que há maior quantidade de colisões entre as moléculas do substrato e as enzimas. Porém, qualquer aumento adicional, que faça ultrapassar a temperatura ótima, provocará uma diminuição drástica da atividade da enzima, pois incitará uma quebra das ligações moleculares existentes, conduzindo à desnaturação da enzima. (Daniel, et al 2008). Esta variação da atividade enzimática, com a temperatura, segue uma configuração típica, conforme demonstrado na Figura 12, no entanto, as faixas de temperaturas que provocam estas alterações variam com o tipo de enzima (Worthington, et al., 2016).

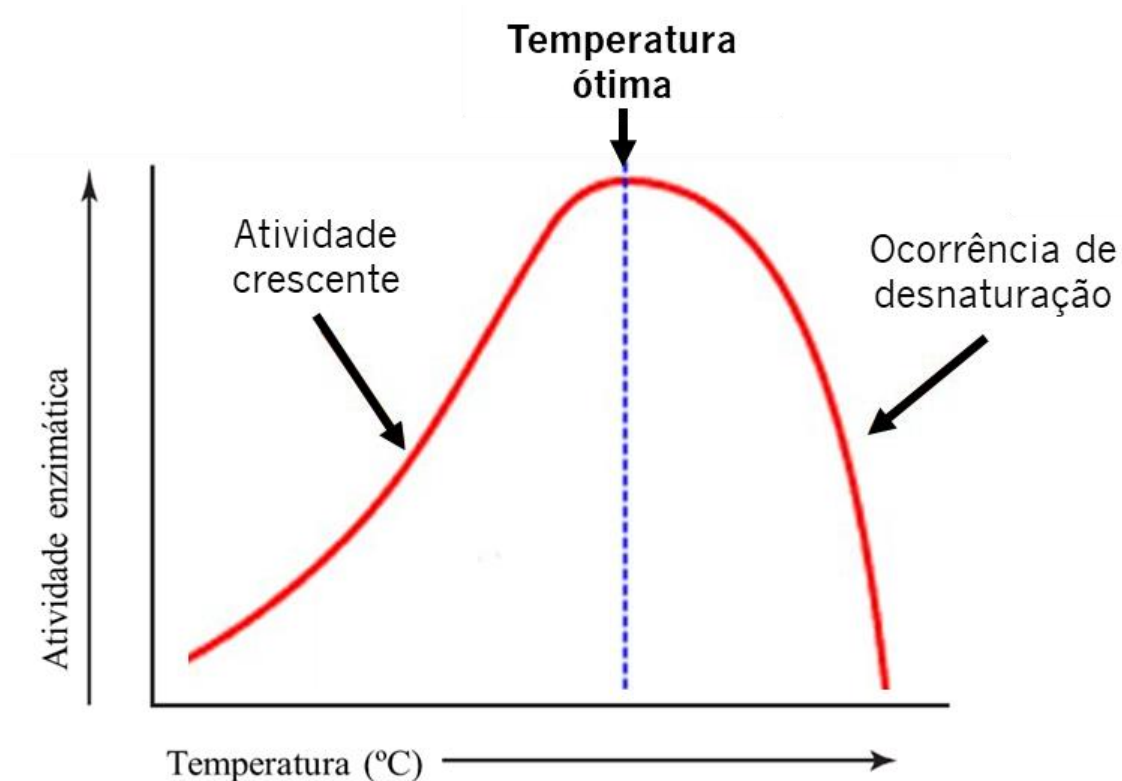


Figura 12: Efeito da temperatura na atividade enzimática (adaptado de BioQuímica,s.d.).

Nos ensaios de otimização da temperatura da enzima PEC vínica (Figura B8 e B9 do anexo B) foi possível perceber que esta enzima é extremamente sensível a variações de temperatura - pequenas oscilações provocam grandes mudanças na atividade enzimática da PEC e na sua reprodutibilidade.

Com o intuito de estudar o efeito da temperatura na atividade da PEC, e de forma a obter um perfil de atividade enzimática em função da temperatura na região da atividade crescente – semelhante à parte inicial do gráfico da Figura 12 - foram realizados cinco ensaios às temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C 30 °C e 35 °C, através do AC. A temperatura máxima escolhida foi de 35 °C, pois , muitas enzimas, como são proteínas, desnaturam rapidamente a temperaturas próximas dos 40 °C, devido à quebra das suas ligações (Worthington, et al., 2016). Para além disso, esta enzima PEC, por ser aplicada em vinhos, é mais sensível à variação de temperatura (conforme verificado nos ensaios de otimização das condições de operação, secção 4.1). Uma outra razão para a escolha desta temperatura máxima tem haver com o facto de não ser relevante estudar o efeito de temperaturas elevadas nesta enzima, uma vez que o processamento do mosto e do vinho é feito a temperaturas mais baixas. Posteriormente, com o propósito de averiguar se os campos elétricos moderados do AO impulsionam mudanças na atividade enzimática da PEC, foram realizados, de forma semelhante, cinco ensaios às temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C 30 °C e 35 °C, com a adição de um campo elétrico de 7 V/cm e com uma frequência 25 kHz. Para se conseguir estas variações de temperatura, mantendo o campo elétrico e a frequência constantes, foi necessário usar um banho de refrigeração a diferentes temperaturas – 11 °C, 17 °C, 22 °C, 27 °C e 32 °C, respetivamente.

Na Figura 13 encontra-se um gráfico que traduz a relação da atividade enzimática da PEC, pelo AO e pelo AC, em função temperatura. Os ensaios realizados pelo AC serviram como controlo face aos ensaios pelo AO, uma vez que se pretende analisar os efeitos não térmicos desta tecnologia na atividade enzimática da PEC vínica.

Pela análise do gráfico é possível perceber que, quer pelo AC, quer pelo AO, existe uma tendência crescente da atividade enzimática com o aumento da temperatura, estando de acordo com a representação gráfica padrão ilustrada na Figura 12. Para ambos os casos, pela análise da Figura 13, a temperatura ótima de atuação desta enzima situar-se-á por volta dos 35 °C. Esta enzima é, maioritariamente, usada para a clarificação de mosto de vinho, o que significa que é adicionada ao mosto à temperatura ambiente. Por esta razão esta enzima irá funcionar a temperaturas na ordem dos 20 °C (Kostelac, et al., 2020; Merín, et al., 2015), onde o uso do AO aparenta trazer benefícios.

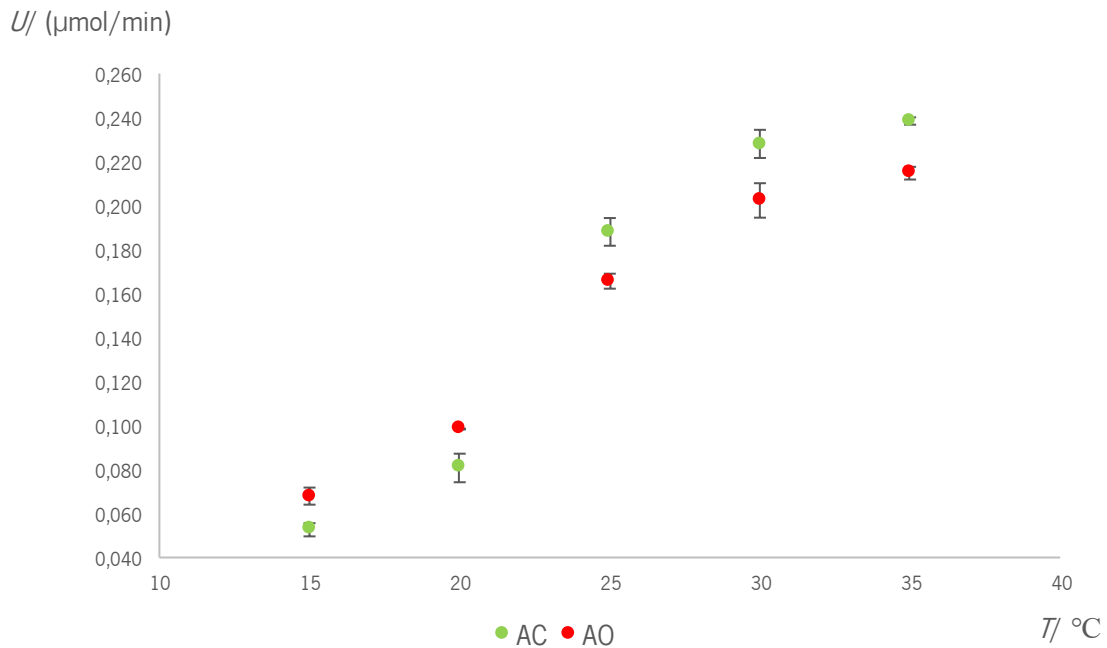


Figura 13: Relação entre a atividade enzimática da PEC vínica e a temperatura de 15 °C, 20 °C, 25°C, 30 °C e 35 °C pelo AC e AO. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.

Os dois métodos, no que concerne à inclinação crescente, são semelhantes, porém, quando se analisa, pontualmente, os valores de atividade enzimática em cada temperatura é notória uma diferença significativa, demonstrando que os campos elétricos moderados do AO provocam um efeito adicional na atividade da PEC vínica. Se o AO apenas apresentasse efeitos térmicos, então, a atividade enzimática, obtida através dos dois métodos, seria idêntica. Na Tabela 5 encontram-se discriminados os valores da atividade enzimática, adquiridos pelos dois métodos de aquecimento, em cada temperatura, assim como a diferença percentual do AO em relação ao AC (controle). Esta tabela demonstra que, efetivamente, existe uma diferença significativa entre os valores de atividade obtidos pelo AC e AO.

À temperatura de 15 °C e 20 °C o AO incrementa ativação enzimática na ordem dos 20 % a 30 %, enquanto que para as temperaturas superiores o AO fomenta inativação na ordem dos 10 %. Estes resultados estão em concordância com vários estudos realizados com outras enzimas. Samaranayake & Sastry, 2016 verificaram que a enzima PME à temperatura de 70 °C e sob um campo elétrico de 8 V/cm era ativada, enquanto que, para temperaturas superiores sofria inativação. Zhang, et al., 2018 estudaram os efeitos do AO na enzima PPO e concluíram que aplicando um campo elétrico de frequência 20 kHz e voltagem de 900 V, à temperatura de 50 °C a enzima sofre uma ativação de 45 %, enquanto que à temperatura de 70 °C sobre uma inativação de 56 %. Por fim, Makroo, et al., 2020 constataram que à

temperatura de 60 °C a enzima POD sofreu um aumento de atividade pelo AO face ao convencional, enquanto que para a temperatura de 80 °C sofreu uma redução de atividade de 27 %. No entanto, é importante referir que neste caso, as reações ocorreram a temperaturas significativamente mais baixas do que as descritas no estudos anteriormente referidos.

Tabela 5: Atividade enzimática da PEC vínica à temperatura de 15 °C, 20 °C, 25°C, 30 °C e 35 °C, obtida pelos dois tipos de aquecimento – AO e AC.

T/°C	Aquecimento convencional		Aquecimento óhmico		Diferença percentual/ %	Teste T-student P(T≤t)
	U/ μmol/min	Desvio – padrão	U/ μmol/min	Desvio – padrão		
15	0,0526	0,0030	0,0679	0,0039	+29	0,0057*
20	0,0807	0,0065	0,0984	0,0002	+22	0,0421*
25	0,1880	0,0063	0,1656	0,0034	-12	0,0056*
30	0,2280	0,0064	0,2023	,0078	-11	0,0117*
35	0,2384	0,0017	0,2147	0,0029	-10	0,0003*

* P(T ≤ t) < 0,05 (nível de significância selecionado) – existe diferença significativa entre a atividade obtida pelo AO e pelo AC

A diferença entre a atividade enzimática obtida pelo AC e pelo AO pode ser explicada pelos efeitos elétricos nas moléculas (Knirsch, et al., 2006; Samaranyake & Sastry, 2016). Os campos elétricos moderados, aplicados durante o AO, sugerem um aumento da energia cinética, causada pelo movimento eletroforético das enzimas, o que simula a existência de uma temperatura real superior à teoricamente imposta (Li, et al., 2019 e Samaranyake & Sastry, 2016). Este aumento da energia cinética faz com que aconteça um efeito equivalente ao aumento da temperatura, ao qual, Samaranyake & Sastry, 2016, atribuíram a denominação de “temperatura elétrica”. Para temperaturas mais baixas do meio, o AO provoca um aumento da atividade das enzimas, pois estas passam a operar a uma temperatura aparentemente superior, mas mantendo-se abaixo da temperatura ótima de atividade, isto é, a temperatura limite a partir da qual ocorrerá inativação térmica. Por outro lado, quando a temperatura do meio é mais elevada, os campos elétricos moderados irão simular uma temperatura ainda mais elevada, o que faz com que a temperatura global seja capaz de ultrapassar o pico de atividade causando inativação da enzima (Li, et al., 2019; Brochier, et al., 2016; Samaranyake & Sastry, 2016).

Jakób, et al., 2010, em testes semelhantes realizados na ALP, PME e POD, verificou que, no processamento pelo AO, apenas a entropia (grandeza termodinâmica associada ao grau de desordem

das moléculas) é alterada, enquanto que a entalpia (grandeza física definida como a energia armazenada nas ligações das moléculas e que pode ser libertada sob a forma de calor) se mantém inalterada, em relação ao processamento pelo AC. Esta variação na entropia pressupõe que o campo elétrico não modifique a estrutura terciária da enzima, mas que modifique o ambiente envolvente da enzima, aumentando o número de iões e alterando as suas distribuições à volta das enzimas.

Com este estudo, o efeito térmico do AO foi eliminado como variável, o que permite inferir que a frequência e o campo elétrico influenciam a atividade enzimática da PEC vínica. No entanto, como os efeitos da variação destes parâmetros na PEC vínica ainda não são conhecidos, surge a necessidade de procurar investigar cada um deles, individualmente, de forma a perceber que alterações provocam.

4.3.2 Efeito da frequência

O gerador de sinal utilizado permite escolher o tipo de onda a aplicar. Para este trabalho foi escolhida a onda sinusoidal, dado ser o tipo de onda mais simples e o mais usado no processamento óhmico (Sastri, 2008). Uma onda sinusoidal é caracterizada por quatro grandezas - frequência (F), amplitude (A), comprimento de onda (λ) e período (T), conforme ilustrado na Figura 14.

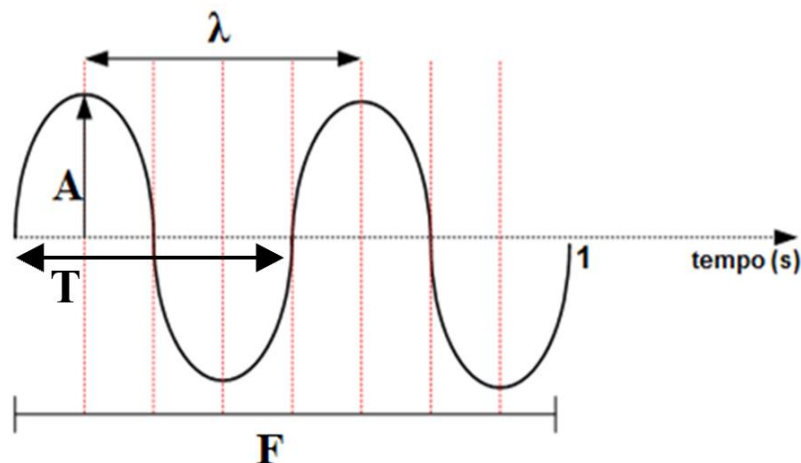


Figura 14: Onda Sinusoidal (adaptado de Idema, 2020).

A frequência corresponde ao número de ciclos completos que ocorrem no intervalo de um segundo, e a sua unidade SI é o Hertz (Hz). A amplitude (A) é a distância em metros (m) entre o ponto de equilíbrio e a crista da onda. O comprimento de onda (λ) é a distância em metros (m) entre o início

e o fim de um ciclo de uma onda. O período (T) é o tempo em segundos (s) que uma onda sinusoidal demora a completar um ciclo (Idema, 2020).

Para estudar o efeito da frequência na atividade da PEC vínica foi necessário fixar um valor de temperatura e de campo-elétrico de forma a que esta grandeza fosse a única variável. Pela análise da Figura 13 foi mantido um campo elétrico 7 V/cm e testadas duas temperaturas, nomeadamente: a 20 °C - representa o cenário mais próximo da temperatura ambiente, no qual o AO provoca um aumento da atividade enzimática; e a 30 °C - AO determina inativação enzimática face ao AC – intuito de perceber se essa inativação pode ser ou não influenciada pela a variação da frequência. Porém, é importante referir que a temperatura de 20 °C é a que encerra maior interesse para a aplicação na etapa de clarificação do mosto de Vinho Verde.

Para os dois cenários de temperatura foram analisados cinco valores de frequências – 50 Hz; 100 Hz; 500 Hz; 2 kHz e 25 kHz. De forma análoga ao teste da temperatura, houve sempre a realização de controlos pelo método convencional, à temperatura correspondente. Para que fosse possível manter a temperatura e o campo elétrico constante, variando a frequência foi necessário a utilização de um banho de refrigeração a diferentes temperaturas. Quando a temperatura pretendida foi de 20 °C, o banho foi usado a temperaturas entre os 16 °C e os 17 °C. Quando a temperatura selecionada foi de 30 °C, as temperaturas a que o banho foi colocado variaram entre os 25 °C e os 26 °C.

A maioria dos estudos desenvolvidos com o AO são realizados a baixas frequências (≤ 50 Hz), pois estas permitem que as cargas se movam, entre os elérodos, mais devagar e que se acumulem à superfície das paredes celulares, promovendo alterações nos microrganismos (Knirsch, et al., 2010). Outra hipótese de mecanismo diz respeito a um movimento mais lentos das cargas, permitindo uma melhor transferência de massa entre o meio e o interior dos microrganismos (Lima & Sastry, 1999). Por outro lado, as frequências mais elevadas (na ordem dos kHz) provocam um movimento muito rápido das cargas o que dificulta a sua acumulação em superfícies. Por esta razão, as baixas frequências terão maior capacidade de influenciar a atividade dos microrganismos. Devido há escassez de análises conduzidas a altas frequências, o estudo das temperaturas, retratado na Figura 13, foi realizado à frequência mais elevada permitida pelo equipamento. Como se verificaram diferenças significativas a frequência elevada (de 25 kHz, ver Tabela 5), então, foi estabelecido que estas análises seriam conduzidas em regime de baixas e a altas frequências.

Na Figura 15 encontra-se a relação da atividade enzimática com a frequência à temperatura de 20 °C, assim como o respetivo controlo pelo AC.

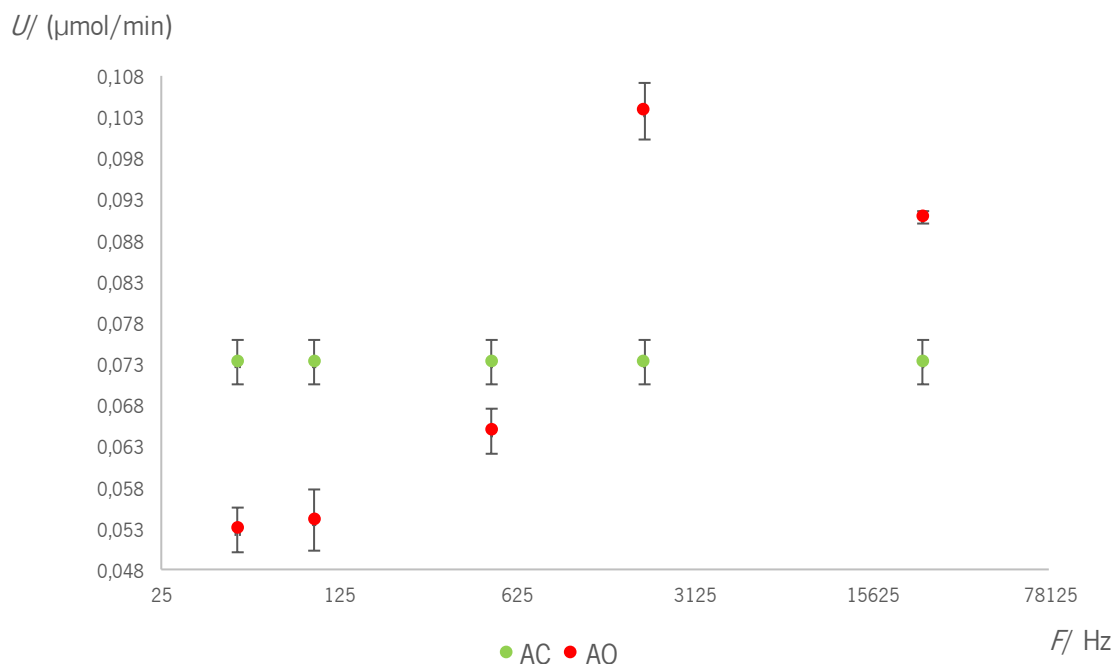


Figura 15: Relação entre a atividade enzimática da PEC vínica e a frequência de 50 Hz, 100 Hz, 500 Hz, 2 kHz e 25 kHz, a 20 °C, pelos dois tipos de aquecimento - AC e AO. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.

Pela observação deste gráfico, é perceptível que a frequência tem uma grande influência na atividade enzimática da PEC vínica a 20 °C. A baixas frequências, o AO apresenta um carácter inibidor, porém a atividade enzimática é crescente, atingindo um máximo a 2 kHz, onde já apresenta um comportamento ativador. A 25 kHz, apesar do AO possibilitar ativação, é significativamente menor.

A frequência mais baixa testada - 50 Hz - foi aquela que provocou uma maior inativação enzimática. As enzimas são proteínas que, em meio aquoso, apresentam carga elétrica e momentos dipolo e que, por isso, respondem à variação do campo elétrico. As baixas frequências são responsáveis pela remoção de grupos prostéticos metálicos das enzimas, que os possuem, e por mudanças conformacionais (Castro, et al., 2006; Samaranayake & Sastry, 2016 b). A PEC é uma enzima que não apresenta grupos prostéticos (Castro, et al., 2006), por isso é possível que o efeito inibitório das baixas frequência se deva, essencialmente, a alterações conformacionais indesejáveis, dificultado a sua ligação com moléculas de pectina, havendo uma produção deficiente de ácido glucónico. Estas alterações conformacionais podem ter sido causadas pela acumulação de cargas na superfície da enzima ou pelo aparecimento de compostos resultantes de reações paralelas (como por exemplo reações eletroquímicas), que ocorrem devido á passagem da corrente elétrica, e que se ligam à enzima.

Este comportamento inibitório a baixas frequências está de acordo com o estudo realizado por Samaranyake & Sastry, 2016 b, no qual a enzima PME apresenta a maior percentagem de inativação - 26 % - na gama de frequências entre 1 Hz e 60 Hz. Apesar da gama de frequências estuda por eles ter sido, apenas até 1 kHz, a inativação provocada entre 100 Hz e 1 kHz foi significativamente menor. Porém, no caso da enzima POD estudada por Brochier, et al., 2019, as baixas frequências, principalmente a 10 Hz, permitiram um aumento da atividade enzimática. Este comportamento foi, também, explicado por a alterações conformacionais, mas neste caso benéficas – as reações paralelas que ocorrem a baixas frequências, como a eletrólise da água e a corrosão de elétrodos, libertam componentes que, neste caso, quando interagem com as enzimas provocam mudanças vantajosas na conformação do sítio ativo, tornando-o mais protegido e facilitando a ligação das moléculas de substrato (Sakr & Liu 2014; Brochier, et al., 2019). Samaranyake & Sastry, 2018, verificaram que a α -amilase era ativada em cerca de 41 % a frequências entre 1 Hz e 60 Hz e, que para frequências iguais ou superiores a 100 Hz havia dois cenários – ou ocorria ativação, mas menor (cerca de 17 %), ou não havia alteração da atividade com o aumento da frequência. As baixas frequências, neste caso, foram apontadas como benéficas na hidrólise do amido.

Ensaio conduzidos a altas frequências (superiores a 1 kHz) são escassos pois a rápida alteração do campo é apontada como pouco letal. Contudo, pela análise da Figura 15, neste caso as altas frequências (entre os 2 kHz e os 25 kHz) aparentam possuir um carácter benéfico na atividade da PEC vínica, promovendo a sua atividade. As altas frequências parecem provocar menos alterações conformacionais prejudiciais (Samaranyake & Sastry, 2016b) e, devido à rápida oscilação do campo elétrico que provocam, poderão possibilitar maiores colisões entre a enzima – PEC – e o substrato – pectina (Li, 2019). A frequência também poderá modificar a estrutura secundária das enzimas, permitindo um acesso mais facilitado do substrato ao centro ativo da enzima, resultando num aumento da atividade enzimática (Brochier, et al., 2019).

Na Tabela 6 encontram-se discriminados os valores da atividade enzimática - controlo e AO, permitindo analisar, percentualmente, o efeito adicional causado pelas diferentes frequências usadas no AO em relação ao controlo - AC.

Pela análise da Tabela 6 é verificado que nas frequências mais baixas a percentagem de inativação é semelhante ao valor determinado por Samaranyake & Sastry, 2016b, na enzima PME.

Tabela 6: Atividade enzimática da PEC vinica em função da frequência de 50 Hz, 100 Hz, 500 Hz, 2 kHz e 25 kHz, a 20 °C, pelos dois tipos de aquecimento - AC e AO

F/Hz	Aquecimento convencional		Aquecimento óhmico		Diferença percentual/ %	Teste T-student P(T≤t)
	U/ μmol/min	Desvio – padrão	U/ μmol/min	Desvio – padrão		
50	0,0732	0,0027	0,0528	0,0027	-28	0,0003*
100			0,054	0,0037	-26	0,0014*
500			0,0648	0,0027	-11	0,0074*
2000			0,1037	0,0034	42	0,0002*
25000			0,0908	0,0008	24	0,0004*

* P(T ≤ t) < 0,05 (nível de significância selecionado) – existe diferença significativa entre a atividade obtida pelo AO e pelo AC

Além dos possíveis efeitos não térmicos associados à variação da frequência, anteriormente citados, a variação da atividade provocada pelo AO, poderá, também, estar relacionada com o aumento da “temperatura elétrica”. Com o constante aumento da frequência, mais rápido será o movimento das enzimas, elevando a sua energia cinética e conseqüentemente havendo a simulação de uma temperatura superior à teoricamente imposta, na mistura reacional (Li, et al., 2019). O crescente aumento da “temperatura elétrica” com a frequência parece ser uma hipótese plausível para o comportamento da enzima – Para frequências muito altas (25 kHz), a temperatura simulada será superior à ótima e a atividade da enzima já se encontra com um comportamento decrescente; para frequências mais baixas (50 Hz – 500 Hz) apesar de haver inativação enzimática, esta é cada vez menor, encaminhando-se para uma condição ótima de atividade que corresponde à frequência de 2 kHz, na qual há um aumento de atividade de 42 %. Esta condição é extremamente promissora, pois significa que, usando o AO potencializamos o funcionamento da enzima em mais 42 %, comparativamente com a atividade que ela possuiu quando usada, apenas, a 20 °C. Para além disso, pela Tabela 6 é notório que as diferenças existentes entre as atividades obtidas pelo AC e pelo AO são significativas, para todos os valores de frequência, sobretudo para a 2 kHz .

Na Figura 16 encontra-se a relação da atividade enzimática com a frequência à temperatura de 30 °C, assim como o respetivo controlo pelo AC.

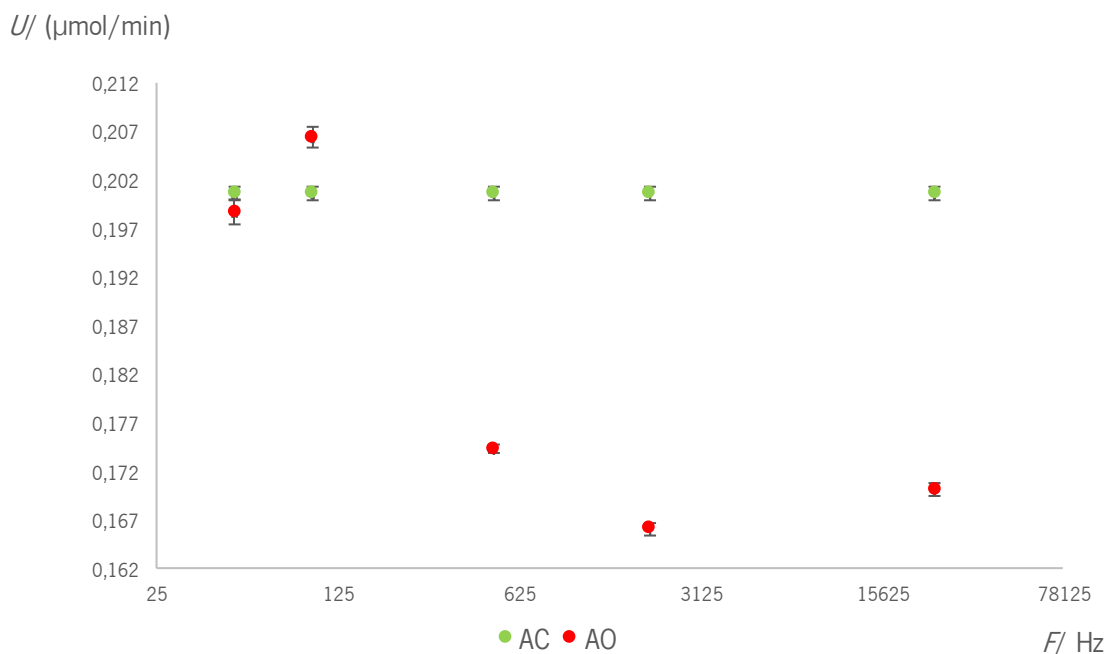


Figura 16: Relação entre a atividade enzimática da PEC vínica e a frequência de 50 Hz, 100 Hz, 500 Hz, 2 kHz e 25 kHz, a 30 °C, pelos dois tipos de aquecimento - AC e AO. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.

Comparando os dados expressos nas Figura 15 e 16 é notório que os efeitos causados pelas mesmas frequências, a temperaturas diferentes, são bastante distintos.

Pela análise da Figura 13, o AO usado a 30 °C e a uma frequência de 25 kHz não apresentava um carácter benéfico para a atividade da PEC vínica. Porém, como referido anteriormente, vários autores relatam cenários de ativação a frequências mais baixas. Apesar de isso não se ter verificado na Figura 15, o ensaio a 30 °C foi conduzido com o objetivo de possível inversão do comportamento inativador retratado na Figura 13. Os resultados obtidos, ilustrados na Figura 16 sugerem que, efetivamente, frequências mais baixas podem promover ativação enzimática, enquanto que nas frequências mais altas existe inativação enzimática. De forma análoga o aumento da frequência poderá provocar um aumento da “temperatura elétrica”, elevando a temperatura global da mistura reacional a valores acima do ótimo, o que provoca desnaturação da enzima e conseqüente inativação enzimática. Poderá haver, igualmente, alterações conformacionais da enzima.

Na Tabela 7 são apresentados, detalhadamente, os valores da atividade enzimática - controlo e AO, e a diferença percentual do AO em relação ao AC.

Tabela 7: Atividade enzimática da PEC vínica em função da frequência de 50 Hz, 100 Hz, 500 Hz, 2 kHz e 25 kHz, a 30 °C, pelos dois tipos de aquecimento - AC e AO

F/Hz	Aquecimento convencional		Aquecimento óhmico		Diferença percentual/%	Teste T-student P(T≤t)
	U/ μmol/min	Desvio – padrão	U/ μmol/min	Desvio – padrão		
50	0,2006	0,0007	0,1987	0,0013	-1	0,0807**
100			0,2064	0,0011	3	0,0015*
500			0,1743	0,0004	-13	6,46 x 10 ^{-*}
2000			0,1660	0,0006	-17	3,79 x 10 ^{-*}
20000			0,1701	0,0007	-15	6,74 x 10 ^{-*}

* P(T ≤ t) < 0,05 (nível de significância selecionado) – existe diferença significativa entre a atividade obtida pelo AO e pelo AC

** P(T ≤ t) > 0,05 (nível de significância selecionado) – não existe diferença significativa entre a atividade obtida pelo AO e pelo AC

Pela análise da Tabela 7 é possível verificar que o AO a 30 °C possui um efeito menor, em todas as frequências, comparativamente com o ensaio a 20 °C (Tabela 6), uma vez que as diferenças percentuais obtidas são menores.

Na frequência de 100 Hz foi possível reverter a inativação enzimática apresentada na Figura 13, porém este aumento foi de apenas 3 %, apesar de esta elevação da atividade enzimática ser estatisticamente significativa ($p < 0.01$). A 50 Hz a variação entre os dois tipos de aquecimento não foi significativa.

A 30 °C, a frequência de 100 Hz é a mais promissora, uma vez que é a condição que permite obter maior valor de atividade enzimática da PEC. Porém, a elevação que o AO, nesta situação, permitiu (3 %) é pouco relevante quando comparado com o aumento da atividade que o AO provoca a 20 °C e 2000 Hz (42 %).

4.3.3 Efeito do campo elétrico

O campo elétrico é uma propriedade elétrica associada a cada carga elétrica existe no espaço e que exerce força sobre todas as outras cargas presentes no campo, atraindo-as ou repelindo-as. A magnitude e a direção do campo elétrico são expressas pelo valor de E, cuja unidade do SI é newtons por coulomb (N/C), equivalente a volts por metro (V/m), designado como força do campo elétrico, intensidade do campo elétrico ou apenas campo elétrico (Encyclopaedia Britannica, 2019).

O AO usa uma faixa de intensidade de campo específica – campos elétricos menores ou iguais a 1000 V/cm, o que permite que seja classificado como um processo de campo elétrico moderado (Sastry, 2008).

Os ensaios de temperatura e de frequência foram conduzidos sob a influência de um campo elétrico de 7 V/cm. Tendo este valor como referência, visto ter provocado efeitos significativos na atividade enzimática da PEC vínica, para a análise do efeito do campo elétrico foram escolhidos mais quatro valores de intensidade de campo elétrico. As intensidades de campo analisadas foram de 0 V/cm, 0,2 V/cm, 2 V/cm, 7 V/cm e 14 V/cm. O valor de 0 V/cm é equivalente ao tratamento pelo AC. Os campos elétricos foram estudados a 20 °C e 2 kHz e a 30 °C e 100 Hz (melhores condições obtidas anteriormente). Para ser possível a variação da intensidade do campo a 20 °C o banho de refrigeração foi usado a diferentes temperaturas para cada campo elétrico – 19,2 °C, 19,0 °C, 18,7 °C, 16,1 °C e 5,4 °C, respetivamente; no ensaio conduzido a 30 °C o banho de refrigeração foi usado à temperatura de 29,8 °C, 29,6 °C, 29,4 °C, 25,9 °C e 9,2 °C, respetivamente.

O campo elétrico é apontado como uma variável capaz de fazer variar a atividade de várias enzimas. Contudo, o comportamento que desencadeia – ativação ou inativação - depende das enzimas em estudo e das condições a que são sujeitas. Um aspeto que parece ser comum é a intensidade do comportamento – a campos elétricos mais baixos a variação da atividade enzimática é pequena e a campos elétricos de intensidade moderada a alta a atividade tem uma variação maior (Makroo, et al., 2020; Samaranayake & Sastry, 2018).

Na Figura 17 encontra-se a representação gráfica da atividade enzimática da PEC vínica em função do campo elétrico à temperatura de 20 °C.

A atividade enzimática é fortemente influenciada pelo campo elétrico, permitindo, neste caso, apenas ativação enzimática - o ambicionado, uma vez que a atividade da PEC é extremamente importante no mosto de Vinho Verde.

Até ao campo elétrico de 7 V/cm, a atividade enzimática teve um comportamento crescente, diminuindo no valor de intensidade de 14 V/cm. Estes resultados são idênticos aos obtidos por Li, et al., 2019 – os campos elétricos de intensidade 22 V/cm, 27,5 V/cm e 36,5 V/cm provocaram um crescente aumento da atividade da enzima POD. De forma semelhante, Samaranayake & Sastry, 2016a mostraram que a enzima PME apresenta um crescente aumento de atividade entre 5 V/cm (aumento pouco significativo) e 10 V/cm (maior incremento na atividade). De forma análoga ao efeito da frequência, estes investigadores defendem que os campos elétricos provocam mudanças conformacionais benéficas, aumentando a interação enzima – substrato e que podem afetar as reações bioquímicas, alterando o

espaçamento molecular e aumentando as reações inter-cadeia nas enzimas. Porém, no caso de enzimas que possuem grupos prostéticos, o campo elétrico é responsável pela sua remoção. Li, et al., 2019 mostraram que, no caso da enzima PPO, o campo elétrico força a migração de íons metálicos nas enzimas - quanto maior a intensidade do campo maior a inativação desta enzima.

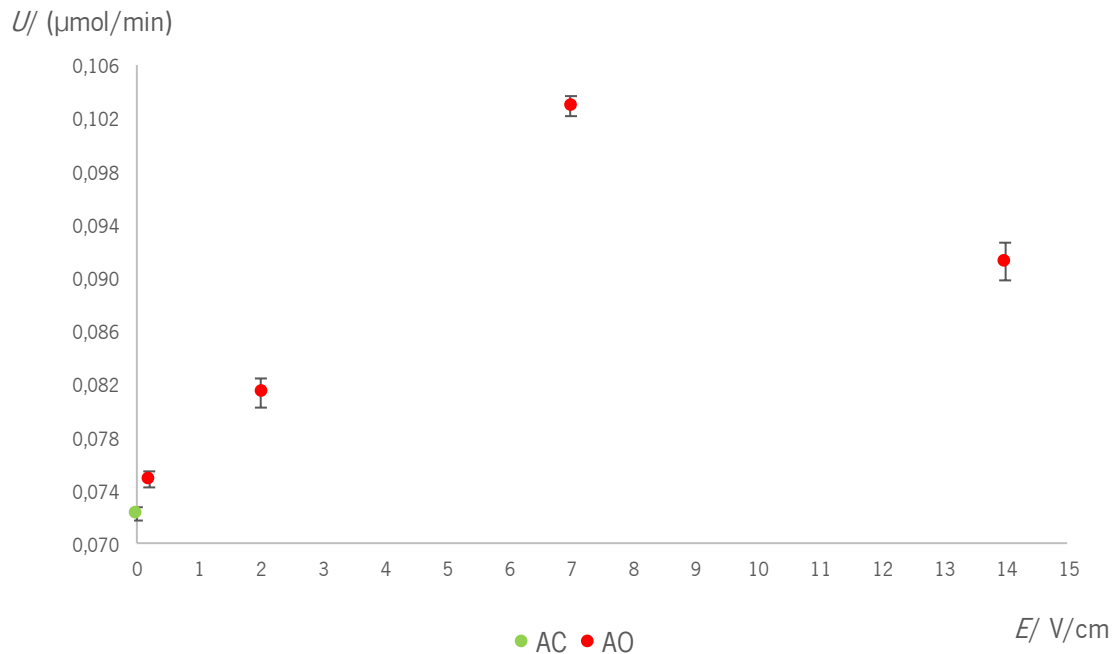


Figura 17: Relação entre a atividade enzimática da PEC vínica e os campos elétricos de intensidade 0V/cm (AC), 0,2 V/cm, 2 V/cm, 7 V/cm e 14 V/cm, conseguidos pela aplicação do AO, à temperatura de 20 °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.

Com o intuito de perceber a influência do campo elétrico nas enzimas, Samaranayake & Sastry, 2016a fizeram a análise cinética da enzima PME e perceberam que com o aumento da intensidade do campo, maior é a eficácia do efeito. Estudaram, igualmente, os movimentos moleculares desta enzima com a variação da intensidade do campo. Os cálculos resultantes deste estudo permitiram comprovar que existe um aumento significativo da “temperatura elétrica” com o aumento da intensidade do campo. Esta elevação da “temperatura elétrica” é resultante do aumento da energia cinética devido à maior rapidez do movimento eletroforético das enzimas.

Pela análise da Figura 17 o aumento da “temperatura elétrica” será benéfico até ao campo de intensidade 7 V/cm, onde a temperatura real será próxima da ótima. Porém, na intensidade de 14 V/cm a atividade enzimática sofre um decréscimo. Esta diminuição neste ponto poderá estar relacionada com

a elevação da temperatura global, acima da ótima, e com a baixa temperatura do banho de refrigeração, que poderá causar um aquecimento não uniforme à mistura de reação, levando ao aparecimento de gradientes térmicos.

Na Figura 18 encontra-se a representação gráfica da atividade enzimática da PEC vinica com o campo elétrico à temperatura de 30 °C.

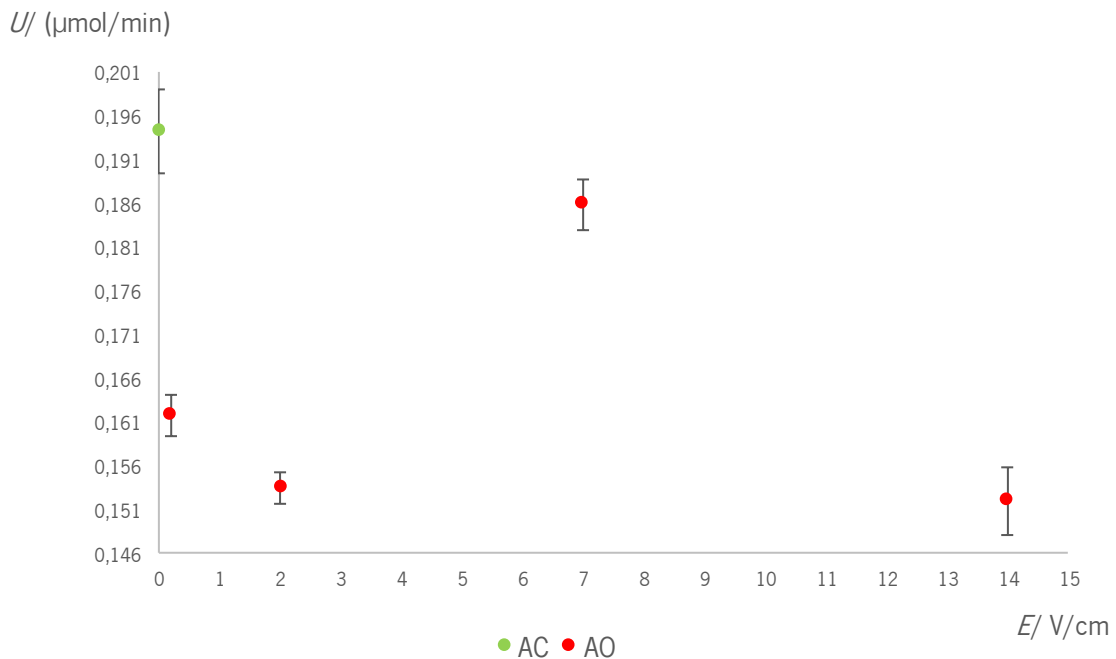


Figura 18: Relação entre a atividade enzimática da PEC vinica e os campos elétricos de intensidade 0V/cm (AC), 0,2 V/cm, 2 V/cm, 7 V/cm e 14 V/cm, conseguidos pela aplicação do AO, à temperatura de 30 °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.

À temperatura de 30 °C e frequência de 100 Hz, o campo elétrico provoca, unicamente, inativação enzimática. Na Figura 16 era notório um aumento de 3 % correspondente à condição 30 °C, 100 Hz, 7 V/cm. Como era um aumento pouco significativo pode estar mais sujeito a pequenas variações da temperatura do banho de refrigeração, o que pode ter causado uma pequena oscilação na atividade enzimática. Pela Figura 18, nas mesmas condições ocorreu inativação.

A “temperatura elétrica”, resultante do processamento óhmico, neste caso, possuiu uma forte influência, pois eleva consideravelmente a temperatura, ultrapassando a ótima, o que impossibilita a ativação. Porém, a esta temperatura, os resultados obtidos não seguem o comportamento suposto – maior intensidade do campo, maior inativação. Esta grande variabilidade poderá estar relacionada com

anulação do efeito do campo elétrico, pois de forma a ser possível aumentar a sua intensidade, mantendo a temperatura a 30 °C, é necessário usar um banho de refrigeração a temperaturas cada vez mais baixas. Para os campos elétricos de baixa intensidade (0,2 V/cm e 2 V/cm) o efeito de inativação obtido estará muito próximo da realidade, pois a temperatura do banho é muito próxima da pretendida e, por isso, os efeitos elétricos provocados pela frequência poderão estar na origem da grande percentagem de inativação, elevando a temperatura real acima dos 30 °C. Com o aumento da intensidade do campo é necessário baixar consideravelmente a temperatura do banho – apesar da utilização de agitação um aquecimento não uniforme junto às paredes do reator pode ter provocando a existência de zonas quentes e de zonas frias. Isto faz com que temperatura global da mistura reacional se aproxime mais de 30 °C, no caso do campo de 7 V/cm, e que se aproxime mais dos 20 °C, no caso do campo de 14 V/cm.

Na Tabela 8 são apresentados os valores de atividade enzimática a diferentes condições elétricas e de temperatura.

Pela análise desta tabela é possível eleger a melhor condição de temperatura, frequência e campo elétrico: 20 °C, 2 kHz e 7 V/cm. Nestas condições a atividade da PEC vínica é elevada em cerca de 43 %, - cenário com potencial para ser aplicado no mosto de Vinho Verde. Para além disso, pela análise de T-student, esta condição é a que apresenta a maior variação entre atividade obtida pelos dois tipos de aquecimento.

Tabela 8: Atividade enzimática da PEC viníca a 20 °C e 2 kHz e a 30 °C e 100 Hz sob aplicação de campos elétricos de intensidade 0,2 V/cm, 2 V/cm, 7 V/cm e 14 V/cm.

Temperatura = 20 °C; Frequência = 2 kHz						
E/ V/cm	Aquecimento convencional		Aquecimento óhmico		Diferença percentual/ %	Teste T-student P(T≤t)
	U/ μmol/min	Desvio – padrão	U/ μmol/min	Desvio – padrão		
0,2	0,0722	0,0005	0,0748	0,0006	4	0,0022*
2			0,0813	0,0011	13	0,0003*
7			0,1029	0,0008	43	9,3 x 10 ⁷ *
14			0,0912	0,0014	26	3,1 x 10 ⁵ *
Temperatura = 30 °C; Frequência = 100 Hz						
E/ V/cm	Aquecimento convencional		Aquecimento óhmico		Diferença percentual/ %	Teste T-student P(T≤t)
	U/ μmol/min	Desvio – padrão	U/ μmol/min	Desvio – padrão		
0,2	0,1942	0,0048	0,1617	0,0024	-17	0,0005*
2			0,1534	0,0018	-21	0,0002*
7			0,1858	0,0029	-4	0,0603**
14			0,1519	0,0039	-22	0,0003*

* P(T ≤ t) < 0,05 (nível de significância selecionado) – existe diferença significativa entre a atividade obtida pelo AO e pelo AC

** P(T ≤ t) > 0,05 (nível de significância selecionado) – não existe diferença significativa entre a atividade obtida pelo AO e pelo AC

4.3.4 Validação do método de análise da atividade enzimática

A atividade enzimática dos três tipos de testes realizados foi analisada pelo método de DNS. Para averiguar a validade destes resultados, a melhor condição obtida foi repetida, sendo a atividade enzimática analisada pelo método da ciano acetamida. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 19.

Pela análise do gráfico é notória uma pequena diferença na atividade enzimática: método DNS – atividade de 0,0978 μmol/min; método ciano acetamida - atividade de 0,103 μmol/min. Apesar disso os dois métodos são bastante comparáveis, permitindo confirmar uma ativação na ordem dos 40 % e, por esta razão, os resultados obtidos são considerados válidos – AO à temperatura de 20 °C, frequência de 2 kHz e campo elétrico de 7 V/cm poderá ser aplicado ao mosto de Vinho Verde.

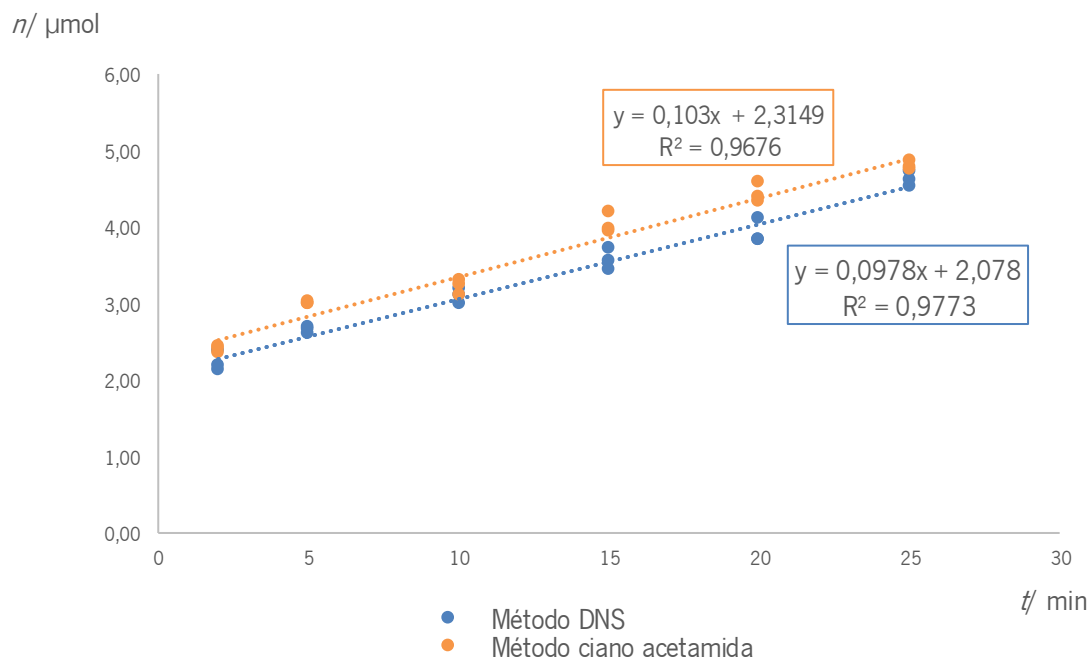


Figura 19: Atividade enzimática da pectinase vínica - Método DNS e Método ciano acetamida.

4.4 Aplicação do AO no mosto de Vinho Verde

O AO, quando aplicado a uma matriz sintética - tampão citrato e pectina, na qual é colocada a PEC vínica, permitiu aumentar a atividade da enzima, resultando numa hidrólise mais rápida da pectina existente no substrato. Ao aplicar esta tecnologia no mosto de Vinho Verde é esperado que seja verificado um comportamento semelhante - PEC hidrolise maior quantidade de pectina, reduza a viscosidade do mosto e torne a mistura mais clara.

A elevada quantidade de açúcares redutores no mosto tornou impossível a utilização do método de DNS para determinar a atividade enzimática durante o tratamento óhmico, uma vez que estes açúcares interferem com a determinação da concentração de ácido galacturónico. Apesar disso foi realizado um ensaio, com o objetivo de usar o método de DNS, diluindo, consideravelmente, as amostras, a fim de tentar determinar uma elevação na concentração de açúcares, que corresponderia à hidrólise da pectina em ácido galacturónico. Porém, a quantidade de pectina no mosto, face a quantidade de açúcares redutores, é muito pequena e, por isso, a variação na concentração de açúcares não é perceptível.

Face à impossibilidade de utilizar o método de DNS foi necessário utilizar outra abordagem – quantificar a pectina existente no mosto, não tratado e tratado pelo AC e pelo AO através da determinação gravimétrica.

Na Figura 20 encontram-se três amostras de mosto – não tratado, tratado pelo AC e tratado pelo AO, respetivamente.



Figura 20: (1) Amostra de mosto não tratado; (2) Amostra de mosto tratado pelo AC; (3) Amostra de mosto tratado pelo AO.

O mosto não tratado é referente ao mosto sem tratamento de clarificação e sem adição da enzima PEC. No mosto tratado pelo AC há adição da PEC e a mistura foi colocada a 20 °C durante trinta minutos. No mosto tratado pelo AO a PEC é, também, adicionada, mas a mistura é tratada a 20 °C e sob a influência de um campo elétrico de intensidade de 7 V/cm e frequência de 2 kHz, durante trinta minutos.

Visualmente é notória uma diferença de coloração entre as amostras – indicativo do funcionamento da enzima PEC. Para além disso, é possível verificar uma diferença de cor entre o mosto tratado pelo AC e AO, revelando que foi alcançada uma maior atividade enzimática pelo tratamento ôhmico.

Na Figura 21 está representada a quantidade de pectina que precipitou em cada uma das amostras de mosto.



Figura 21: Pectina precipitada (1) no mosto não tratado, (2) no mosto tratado pelo AC e (3) no mosto tratado pelo AO.

Pela análise desta figura é facilmente perceptível que existe uma diferença significativa entre a quantidade de pectina existente após trinta minutos de tratamento pelo AC e pelo AO – o AO permitiu que a PEC hidrolisasse mais pectina e, por isso, a quantidade de pectina que precipitou foi menor.

A pectina, depois de seca, foi pesada. A Figura 22 diz respeito à concentração de pectina existente no mosto não tratado e após trinta minutos de tratamento.

No mosto não tratado a concentração de pectina é de cerca de 2,4 g/L. Este valor está dentro da gama de referência para mostos de Vinho Verde – 0,5 g/L a 3,0 g/L (Rizzon, L. et al 2007). Para além disso, este valor é semelhante ao colocado na matriz sintética (2,5 g/L de pectina em tampão), na qual os ensaios de temperatura, frequência e campo elétrico foram conduzidos. Pelo AC, ou seja, à temperatura de 20 °C a PEC hidrolisou a pectina, permitindo que a sua concentração no mosto, após trinta minutos de atividade, passasse a ser de cerca de 2,1 g/L. Pelo AO à temperatura de 20 °C, 2 kHz e 7 V/cm, a atividade da PEC evoluiu conforme o esperado – maior eficiência – permitindo, ao fim de trinta minutos, baixar a concentração de pectina no mosto para um valor próximo de 1,4 g/L.

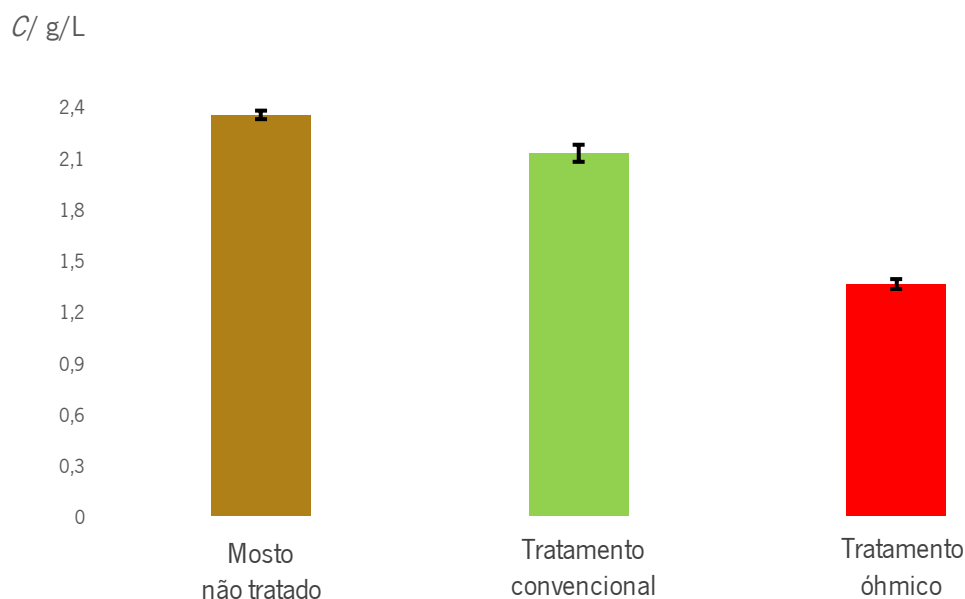


Figura 22: Concentração de pectina precipitada na amostra de mosto não tratado e nas amostras de mosto com pectinase, tratado pelo aquecimento convencional e ôhmico. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de análises em triplicado.

Pela Tabela 9 é possível observar, com mais rigor, a variação da concentração da pectina, assim como a diferença percentual entre o AC e o AO.

Tabela 9: Quantificação da pectina na amostra de mosto não tratado e nas amostras de mosto com pectinase, tratado pelo aquecimento convencional e ôhmico

Mosto	C/ g/L	Desvio - padrão	Redução percentual da pectina/%	Diferença percentual entre tratamentos/%	Teste T-student P(T≤t)	
Não tratado	2,35	0,025	-	-	-	-
Tratado - convencional	2,13	0,05	10*	33***	0,0022*#	2,11x10 ⁵ ***#
Tratado - ôhmico	1,36	0,029	42**		1,46x10 ⁵ **#	

*valor referente à variação da concentração de pectina entre o mosto não tratado e o mosto tratado pelo AC

** valor referente à variação da concentração de pectina entre o mosto não tratado e o mosto tratado pelo AO

*** valor referente à variação da concentração de pectina entre o mosto tratado pelo AC e o mosto tratado pelo AO

P(T ≤ t) < 0,05 (nível de significância selecionado) – existe diferença significativa entre a concentração de pectina obtida no mosto

Pela Tabela 9 é verificado que o AO potencia a atividade da enzima, uma vez que, enquanto que pelo método convencional a PEC apenas hidrolisou 10 % da pectina existente no mosto, pelo AO a PEC teve a capacidade de hidrolisar 42 % da pectina. Isto significa que o AO confere a capacidade de a enzima hidrolisar mais 33 % de PEC, o que torna o processo de clareamento do mosto mais rápido e eficiente a uma temperatura relativamente baixa. Os resultados demonstram que AO promove uma alteração significativa na quantidade de pectina hidrolisada pela PEC, comprovando que esta tecnologia poderá ser bastante relevante na etapa de clarificação do mosto de Vinho Verde.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES FUTURAS

A capacidade do AO provocar alterações na PEC vínica foi comprovada através do estudo do efeito de três variáveis – temperatura, frequência e campo elétrico.

A temperaturas mais baixas o AO incrementou ativação enzimática, enquanto que para temperaturas mais elevadas provocou inativação. A variação existente entre a atividade obtida pelo AO e pelo AC deve-se ao aumento da energia cinética, causada pelo movimento eletroforético das enzimas, que pode ser equivalente ao efeito de um aumento da temperatura reacional. Nesse sentido, o AO revelou-se promissor quando realizado a uma temperatura de 20 °C, próxima da temperatura real à qual, na prática, o mosto de Vinho Verde é tratado, uma vez que nestas condições, a eficácia da atuação da PEC foi aumentada. À temperatura de 20 °C a variação da frequência provocou inativação e ativação enzimática. As baixas frequências (< 500 Hz) foram responsáveis pela inativação enzimática – apontadas como tendo maior letalidade, eventualmente causando alterações conformacionais indesejáveis (que dificultam a ligação do substrato ao centro ativo da enzima). A altas frequências (2 kHz e 25 kHz) houve ativação da PEC – menores alterações conformacionais prejudiciais, modificações benéficas da estrutura secundária da enzima e maiores colisões entre o substrato e a enzima contribuíram para o aumento da atividade da PEC. À temperatura de 20 °C e frequência de 2 kHz o campo elétrico também provocou alterações significativas na atividade enzimática responsáveis, apenas, por um comportamento ativador. O crescente aumento da intensidade do campo elétrico aumenta a interação enzima-substrato e aumenta as reações bioquímicas nas enzimas. O aumento do campo elétrico é, igualmente, responsável pelo aumento da energia cinética, que pode ser equivalente ao efeito de aumento da temperatura da mistura reacional.

Apesar de, no caso da PEC vínica, o AO ter provocado sempre variações e de estas serem reproduzíveis, existe muita controvérsia entre investigadores relativamente aos efeitos que as diferentes condições elétricas causam nos diversos tipos de enzimas. O mecanismo responsável pelos efeitos causados, por esta tecnologia, nas enzimas ainda não é conhecido com rigor técnico, uma vez que existe muita variabilidade entre os estudos já existentes – tipo de enzima, substrato, concentração, pH, temperatura, propriedades elétricas da matriz alimentar (condutividade elétrica) e condições elétricas impostas pelo AO.

O AO influenciou, significativamente, a atividade da PEC vínica nas condições impostas, porém as razões para o comportamento obtido são apenas especulações. A condição ótima de tratamento óhmico encontrada – 20 °C, 2 kHz e 7 V/cm, quando aplicada ao mosto de Vinho Verde, surtiu os efeitos

desejados – maior atividade enzimática, maior hidrólise da pectina, maior aclaramento e redução da viscosidade do mosto. Por outro lado, a combinação das diferentes variáveis estudadas – temperatura, frequência e campo elétrico - oferecem diferentes possibilidades para controlar a atividade enzimática da PEC, mas abrindo igualmente perspectivas de estudos de outras enzimas e respetivas aplicações alimentares. Com este trabalho foi comprovado que o AO é uma técnica promissora para a aplicação na indústria dos Vinhos. Porém, serão necessários mais estudos fundamentais, a fim de elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos provocados na enzima PEC.

Uma vez que o AO surtiu efeitos quando utilizado no processamento do mosto de Vinho Verde, seria interessante, no futuro a realização de um aumento de escala, com acompanhamento de alguns parâmetros ao longo do tempo de tratamento, como a viscosidade e a turbidez. Como, pelos resultados obtidos, foi notório que a pectina foi mais rapidamente hidrolisada, seria interessante aumentar o tempo de tratamento até que fosse alcançada uma completa hidrólise.

Por fim, seria pertinente estudar a cinética enzimática da PEC, de forma a perceber as diferenças na sua atividade quando exposta apenas ao AC e posteriormente ao AO. Para isso os estudos deviam ser conduzidos a diferentes concentrações de substrato, sendo a gama de 0,5 g/L a 3,0 g/L (concentração usual de pectina nos mostos de Vinho Verde) a mais adequada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmaksoud, T. G., Mohsen, S. M., Duedahl-Olesen, L., Elnikeety, M. M., & Feyissa, A. H. (2018). Effect of ohmic heating parameters on inactivation of enzymes and quality of not-from-concentrate mango juice. *Asian Journal of Scientific Research*, *11*(3), 383–392.
- Bach, E., & Schollmeyer, E. (1992). An ultraviolet-spectrophotometric method with 2-cyanoacetamide for the determination of the enzymatic degradation of reducing polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, *203*(2), 335–339.
- Batista, R. (2019). *Cálculo da Pegada Carbónica do Vinho Produzido na Herdade dos Grous*. Faculdade de Ciências e Tecnologia de Lisboa.
- Belda, I., Conchillo, L. B., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016). Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, *223*, 1–8.
- BioEno. (2013). *Bioenzym W Compact Liquid* (pp. 8–9). pp. 8–9.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, *1*(1–6), 41–55.
- Blondin, B. (n.d.). SO₂ Production By Wine Yeast. *Lallemant*, 1–4.
- Bosco, S., Di Bene, C., Galli, M., Remorini, D., Massai, R., & Bonari, E. (2011). Greenhouse gas emissions in the agricultural phase of wine production in the Maremma rural district in Tuscany, Italy. *Italian Journal of Agronomy*, *6*, 93–100.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E., Boulton, R. B., Singleton, V. L., ... Kunkee, R. E. (1999). The Role of Sulfur Dioxide in Wine. *Principles and Practices of Winemaking*, 448–473.
- Brochier, B., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. F. (2016). Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. *LWT - Food Science and Technology*, *74*, 396–403.
- Brochier, B., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. F. (2019). Effect of moderate electric field on peroxidase activity, phenolic compounds and color during ohmic heating of sugarcane juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1–10.
- Cappato, L. P., Ferreira, M. V. S., Guimaraes, J. T., Portela, J. B., Costa, A. L. R., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G. (2017). Ohmic heating in dairy processing: Relevant aspects for safety and quality. *Trends in Food Science and Technology*, *62*, 104–112.
- Cardoso, V. (2015). *Tratamento Biológico de Efluentes Vinícolas através do Reator Biológico de Leito Móvel (MBBR)*. Faculdade de Ciências e Tecnologia de Coimbra.

- Castro, I. (2007). *Ohmic Heating as an alternative to conventional thermal treatment*. Escola de Engenharia da Universidade do Minho.
- Castro, I., Macedo, B., Teixeira, J., & Vicente, A. (2006). The Effect of Electric Field on Important Food-processing Enzymes: Comparison of Inactivation Kinetics under Conventional and Ohmic Heating *Journal of Food Science*, *69*, 696–701.
- Claus, H., & Mojsov, K. (2018). Enzymes for wine fermentation: Current and perspective applications. *Fermentation*, *4*(3), 1–19.
- Climaco, P., Silva, J., Laureano, O., Castro, R, Tonietto, J. (2012). O clima Vitícola das Principais Regiões Produtoras de Uvas para Vinho de Portugal. *CYTED*.
- Clube de vinhos portugueses. Como se produz vinho. Retrieved November 23, 2019, from <https://www.clubevinhosportugueses.pt>
- Comissão das Comunidades Europeias. (1990). Regulamento (CEE) n.º 2676/90 de 17 de Setembro de 1990. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, (3).
- Comissão de Vitivinicultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV). (2015). *Regulamento de Produção e Comércio da DO Vinho Verde / Versão Consolidada 13.06.2015 DJ CVRVV*. 1–17.
- Comissão de Vitivinicultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV). (2019). *Manual de Certificação* (18th ed.).
- Comissão de Vitivinicultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV). (2018). *Guia de rotulagem* (3rd ed.).
- Conselho da União Europeia. (1990). Regulamento (CE) n.º 2676/90 da comissão de 17 de setembro de 1990. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 1–192.
- Conselho da União Europeia. (2008). Regulamento (CE) n.º 479/2008 do conselho de 29 de abril de 2008. *Jornal Oficial Da União Europeia, I Série*(2008/C 115/01), 2584–2590.
- Conselho da União Europeia. (2009). Regulamento (CE) N 606/2009 de 10 de Julho de 2009 que estabelece determinadas normas de execução do Regulamento (CE) n.º 479/2008 no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições aplicáveis. *Jornal Oficial Da União Europeia, L193/1*(6), 1–59.
- Conselho da União Europeia. (2009). Regulamento (CE) n.º 491/2009 do conselho de 25 de Maio de 2009. *Jornal Oficial Da União Europeia*, *154*, 1–56.
- Creative Enzymes. (2011). *Enzymology Assays*. Retirado de <https://www.creative-enzymes.com/>
- Dalagnol, L., Silveira, V., Silva, H., Manfroi, V., & Rodrigues, R. (2017). Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. *Process Biochemistry*, *61*(June), 80–87.

- Daniel, R. M., Danson, M. J., Eisenthal, R., Lee, C. K., & Peterson, M. E. (2008). The effect of temperature on enzyme activity: New insights and their implications. *Extremophiles*, 12(1), 51–59.
- Dar, A. H., Shams, R., Rizvi, Q. ul E. H., & Majid, I. (2020). Microwave and ohmic heating of fresh cut fruits and vegetable products. In *Fresh-Cut Fruits and Vegetables*.
- Demidov, V. I., Ratynskaia, S. V., Rypdal, K., & Introduction, I. (1999). *Sulfur dioxide in Wine*. 70 (11), 4266–4269.
- Dhembare, A. J., Kakad, S. L., & Rana, R. (2015). Effect of pH, temperature and kinetics of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Der Pharmacia Sinica*, 6(8), 1–5.
- Dias, Â. (2016). *Manual de Boas Práticas Ambientais para o Setor da Produção de Vinhos*. Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Politécnico do Porto.
- Divol, B., Du Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), 601–613.
- Durance, T. (2002). Handbook of Food Preservation. In *Food Research International* (Vol. 35).
- Encyclopaedia Britannica. (2019). Electric field. Retrieved October 27, 2020, from Encyclopaedia Britannica website: <https://www.britannica.com/science/electric-field>
- Ermis, E. (2018). Trends in Food Science & Technology Halal status of enzymes used in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 69–73.
- Freitas, A. A., Francelin, M. F., Hirata, G. F., Clemente, E., & Schmidt, F. L. (2008). Effect of peroxidase (POD) and Polyphenoloxidase Enzymes (PPO) on Benitaka and Rubi grape cultivars and on products processe. *Food Science and Technology*, 28(1), 172–177.
- Gavahian, M., Tiwari, B. K., Chu, Y. H., Ting, Y., & Farahnaky, A. (2019). Food texture as affected by ohmic heating: Mechanisms involved, recent findings, benefits, and limitations. *Trends in Food Science and Technology*, 86(January), 328–339.
- Grassino, A. N., Barba, F. J., Brnčić, M., Lorenzo, J. M., Lucini, L., & Brnčić, S. R. (2018). Analytical tools used for the identification and quantification of pectin extracted from plant food matrices, wastes and by-products: A review. *Food Chemistry*, 266(February), 47–55.
- Haida, Z., & Hakimian, M. (2019). A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Science and Nutrition*, 7(5), 1555–1563.
- Halden, K., De Alwis, A., & Fryer, P. (1990). Changes in the electrical conductivity of foods during ohmic heating. *International Journal of Food Science & Technology*, 25(1), 9–25.
- Harris, T. K., & Keshwani, M. M. (2009). Chapter 7 Measurement of Enzyme Activity. In *Methods in Enzymology* (p. 463).

- Henderson, P. (2009). Sulfur Dioxide: Science behind this anti-microbial, antioxidant, wine additive. *Practical Winery and Vineyard*, (Jan/Feb), 1–8.
- Honda, S., Nishimura, Y., Takahashi, M., Chiba, H., & Kakehi, K. (1982). A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide. *Analytical Biochemistry*, 119(1), 194–199.
- Icier, F. (2012). Ohmic Heating of Fluid Foods. In *Novel Thermal And Non-Thermal Technologies For Fluid Foods*.
- Idema, T. (2020). Sinusoidal Waves. Retrieved October 19, 2020, from Physics website: [https://phys.libretexts.org/Bookshelves/University_Physics/Book%3A_Mechanics_and_Relativity_\(Idema\)/09%3A_Waves/9.01%3A_Sinusoidal_Waves](https://phys.libretexts.org/Bookshelves/University_Physics/Book%3A_Mechanics_and_Relativity_(Idema)/09%3A_Waves/9.01%3A_Sinusoidal_Waves).
- Infovini. Vinhos Verdes. Retrieved November 16, 2019, from <https://www.infovini.com>
- Instituto do Vinho e da Vinha (IVV). *Caderno de Especificações do Vinho Verde*. 1–20.
- Instituto do Vinho e da Vinha (IVV). História do Vinho. Retrieved November 16, 2019, from <https://www.iw.gov.pt/np4/272>
- International Organisation of Vine and Wine (OIV). (2015). *Greenhouse gases accounting in the vine and wine sector*.
- International Organisation of Vine and Wine (OIV). Fundamental Texts. Retrieved November 16, 2019, from <https://www.oiv.int/>
- Isle, P., & Cellars, W. (1964). *Use of pectic enzymes in winemaking*. (814).
- Jackson, R. S. (2014) (a). Post-Fermentation Treatments and Related Topics. In *Wine Science*.
- Jackson, R. S. (2014) (b). Fermentation. In *Wine Science*.
- Jackson, R. S. (2014) (c). Chemical Constituents of Grapes and Wine. In *Wine Science*.
- Jackson, R. S. (2014) (d). Site Selection and Climate. In *Wine Science*.
- Jacob, N., Niladevi, K. N., Anisha, G. S., & Prema, P. (2008). Hydrolysis of pectin: An enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiological Research*, 163(5), 538–544.
- Jukanti, A. (2017). *Polyphenol Oxidase(s): Importance in Food Industry*. 93–106.
- Knirsch, M. C., Alves dos Santos, C., Martins de Oliveira Soares Vicente, A. A., & Vessoni Penna, T. C. (2010). Ohmic heating - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(9), 436–441.
- Knirsch, M. C., Alves, C., & Vicente, A. A. (2006). *Aquecimento Óhmico : Novos desafios no tratamento térmico de materiais*. 36–40.

- Kostelac, D., Putnik, P., Markov, K., Frece, J., & Bursac Kovačević, D. (2020). Effects of electro technologies on enzymes in foods and food model systems. *Current Opinion in Food Science*, *31*, 47–56.
- Leizeron, S., & Shimoni, E. (2005). Effect of Ultrahigh-Temperature Continuous Ohmic Heating Treatment on Fresh Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 3519–3524.
- Li, X., Xu, X., Wang, L., & Regenstein, J. M. (2019). Effect of ohmic heating on physicochemical properties and the key enzymes of water chestnut juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, *43*(4), 1–9.
- Lima, M., & Sastry, S. K. (1999). Effects of ohmic heating frequency on hot-air drying rate and juice yield. *Journal of Food Engineering*, *41*(2), 115–119.
- Lindsey, P., Briggs, S., Moulton, K., & Kader, A. (1989). *Sulfites on Grapes: Issues and alternatives* (p. 16). p. 16.
- Lisanti, M. T., Blaiotta, G., Nioi, C., & Moio, L. (2019). Alternative Methods to SO₂ for Microbiological Stabilization of Wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(2), 455–479.
- Lopes, A. (2015). *Gestão ambiental de uma Empresa do Sector Vinícola*. Instituto Politécnico de Bragança.
- Machado, L. F., Pereira, R. N., Martins, R. C., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature. *Journal of Food Engineering*, *96*(4), 520–527.
- Makroo, H. A., Rastogi, N. K., & Srivastava, B. (2020). Ohmic heating assisted inactivation of enzymes and microorganisms in foods: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *97*(January), 451–465.
- Marçal, C. (2014). *Gestão integrada de resíduos do setor vinícola e análise do ciclo de vida do produto*. Instituto Superior de Agronomia de Lisboa.
- Martín-Belloso, O., & Morales-de la Peña, M. (2018). Fruit Preservation by Ohmic Heating and Pulsed Electric Fields. *Food Engineering Series*, 441–456.
- Merín, M. G., Martín, M. C., Rantsiou, K., Cocolin, L., & De Ambrosini, V. I. M. (2015). Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine bonarda grape. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*(3), 815–823.
- Merín, M. G., Mendoza, L. M., & Morata de Ambrosini, V. I. (2014). Pectinolytic yeasts from viticultural and enological environments: Novel finding of *Filobasidium capsuligenum* producing pectinases. *Journal of Basic Microbiology*, *54*(8), 835–842.

- Merin, M. G., Mendoza, L. M., Fariás, M. E., & Morata de Ambrosini, V. I. (2011). Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 144–148.
- Merin, M., & Ambrosini, V. (2015). Highly cold-active pectinases under wine-like conditions from non-Saccharomyces yeasts for enzymatic production during winemaking. *Letters in Applied Microbiology*, 60(5), 467–474.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. (2004). Decreto-Lei nº212/2004. *Diário Da República: 1Série-A*, 5608–5614.
- Müller, W. A., Ferreira Marczak, L., Damasceno, & Sarkis, J. R. (2020). Microbial inactivation by ohmic heating: Literature review and influence of different process variables. *Trends in Food Science and Technology*, 99, 650–650.
- Novozymes Switzerland AG. (n.d.). Test de pectina. *Novozymes – Enzimas Para Uso Enológico*, 2. Retrieved from www.novozymes.com
- Nsude, C. A. (2014). Comparative studies on pectinases obtained from *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* in submerged fermentation system using pectin extracted from mango, orange and pineapple peels as carbon sources. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 28(1), 26-34–34.
- Oliveira, J. (2019). *Instalações, Equipamento e Segurança*. Departamento de Engenharia Biológica - Universidade do Minho.
- Oliveira, J. (2019). *Tecnologia das Vinificações*. Departamento de Engenharia Biológica - Universidade do Minho.
- Olivier, M. N., Cerutti, E. C., & Tomim, G. C. (2008). *Aplicação da enzima pectinase na vinificação*. 133–138.
- Ough, C. S., & Crowell, E. A. (1987). Use of Sulfur Dioxide in Winemaking. *Journal of Food Science*, 52(2), 386–388.
- Oumer, O. J., & Abate, D. (2018). Screening and molecular identification of pectinase producing microbes from coffee pulp. *BioMed Research International*.
- Pereira, R.N., Martins, R.C., and Vicente, A. A. (2012). *LIP reference book, Methodologies, Protocols, Techniques and Equipments*.
- Quinta dos vales. Produção de Vinhos. Retrieved November 23, 2019, from https://www.quintadosvales.eu/vinhos/vindima-manual-manualmente-escolhidos-estabilizacao-a-frio_6679

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud-Funel, A. (2006). The use of Sulphur Dioxide in Must and Wine treatment. *Handbook of Enology*, 1, 774–782.
- Rizzon, L., & Meneguzzo, J. (2007). *Sumo de uva* (1st ed.).
- Rocha, C. M. R., Genisheva, Z., Ferreira-Santos, P., Rodrigues, R., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., & Pereira, R. N. (2018). Electric field-based technologies for valorization of bioresources. *Bioresource Technology*, 254, 325–339.
- Rodrigues, R. M., Vicente, A. A., Petersen, S. B., & Pereira, R. N. (2019). Electric field effects on β -lactoglobulin thermal unfolding as a function of pH – Impact on protein functionality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 52, 1–7.
- Sakr, M., & Liu, S. (2014). *A comprehensive review on applications of ohmic heating (OH)*. 39, 262–269.
- Samaranayake, C. P., & Sastry, S. K. (2016). Effect of moderate electric fields on inactivation kinetics of pectin methylesterase in tomatoes: The roles of electric field strength and temperature. *Journal of Food Engineering*, 186, 17–26.
- Samaranayake, C. P., & Sastry, S. K. (2016). Effects of controlled-frequency moderate electric fields on pectin methylesterase and polygalacturonase activities in tomato homogenate. *Food Chemistry*, 199, 265–272.
- Samaranayake, C. P., & Sastry, S. K. (2018). In-situ activity of α -amylase in the presence of controlled-frequency moderate electric fields. *LWT - Food Science and Technology*, 90(December 2017), 448–454.
- Sanromán, M. A., & Deive, F. J. (2017). *Food Enzymes. In Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*.
- Santhosh, & Lakshmi. The Effects of Temperature on Enzyme Activity and Biology. Retrieved September 16, 2020, from <https://sciencing.com/effects-temperature-enzyme-activity-biology-6049.html>
- Santi, L., Berger, M., & Silva, W. (2014). *Pectinases and Pectin: Commercial Application and Biotechnological*. 11, 130–139.
- Sastry, S. (2008). Ohmic heating and moderate electric field processing. *Food Science and Technology International*, 419–422.
- Sastry, S. K., & Barach, J. T. (2000). Ohmic and inductive heating. *Journal of Food Science*, Vol. 65, pp. 42–46.
- Schaff, C., Seabrook, A., & Westhuizen, T. (2017). Winemaking Enzymes. *Winemaking*, (647).
- Scopes, R. K. (2002). Enzyme Activity and Assays. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6.

- Siguemoto, S., Funcia, E. S., Ed, P., Kubo, M. T. K., Boillereaux, L., Sastry, S. K., & Gut, J. A. W. (2020). *Non-thermal effects of microwave and ohmic processing on microbial and enzyme inactivation: a critical review*. 36–48.
- Silva, L. (n.d.). *Caracterização dos subprodutos da vinificação*. Instituto Politécnico de Viseu.
- Singh, R. S., Singh, T., & Pandey, A. (2019). Chapter 1 - Microbial Enzymes-An Overview. In *Advances in Enzyme Technology*.
- Sogrape. Guia da Vinha. Retrieved November 16, 2019, from <https://www.sograpevinhos.com>
- Sudeep, K. C., Upadhyaya, J., Joshi, D. R., Lekhak, B., Chaudhary, D. K., Pant, B. R., Bajgai, T. R., Dhital, R., Khanal, S., Koirala, N., Raghavan, V. (2020). Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation*, 6(2).
- Tecnilab. (n.d.). *Enologia*. Vol. 10, pp. 1–8.
- Trombly, Amanda Fortier, M. (2019). Carbon Footprint of Wines from the Finger Lakes Region in New York State. *Open Access Journal*, 11, 1–27.
- Uenojo, M., & Pastore, G. M. (2007). Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, 30(2), 388–394.
- Van Loey, A., Verachtert, B., & Hendrickx, M. (2001). Effects of high electric field pulses on enzymes. *Trends in Food Science and Technology*, 12(3–4), 94–102.
- Vida e Vinho. (n.d.). Como o vinho é feito. Retrieved November 23, 2019, from <https://vidaevinho.com/processo-de-producao-do-vinho-2>
- Vieira, R. (2009). *Contribuição para o estudo do tratamento de efluentes da indústria vinícola*. Faculdade de Ciências e Tecnologia de Lisboa.
- Vinho Verde. (n.d.). O vinho verde. Retrieved November 16, 2019, from <https://www.vinhoverde.pt>
- Works, H. I. (2018). *Buffers for Biochemical Reactions What a Buffer System Is and How It Works What Makes a " Good " Buffer*. 1–13.
- Worthington, C., Worthington, V., & Worthington, A. (2016). *Introduction to research Introduction to*. 1–14.
- Zanden, G.-J. (2009). *The truth about CO2 emissions in the wine industry*. Martino Reinventing Chile.
- Zhang, M., Yang, N., Guo, L., Li, D., Wu, S., Wu, F., ... Xu, X. (2018). Physicochemical properties of apple juice influenced by induced potential difference (induced electric field) during disposable continuous-flow treatment. *Journal of Food Engineering*, 234, 108–116.
- Zhang, Y., He, S., & Simpson, B. K. (2018). *Enzymes in food bioprocessing – novel food enzymes, applications, and related techniques*. *Current Opinion in Food Science*. 19, 30–35.

ANEXO A: OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE MEDIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Na Figura A1 encontra-se o gráfico da atividade enzimática obtido pelo método de análise com o reagente de DNS.

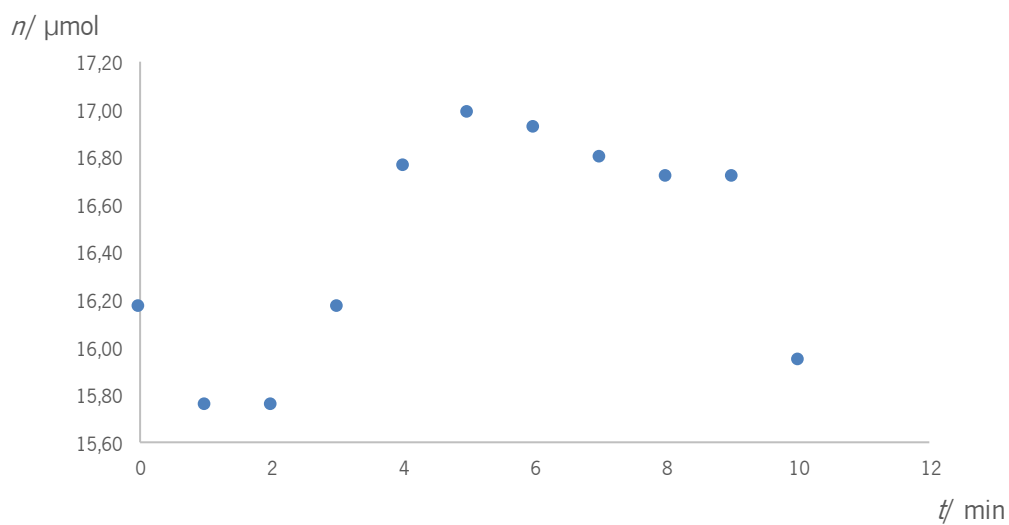


Figura A1: Atividade enzimática – Método DNS.

Na Figura A2 encontra-se o gráfico da atividade enzimática obtido pelo método de análise da ciano acetamida.

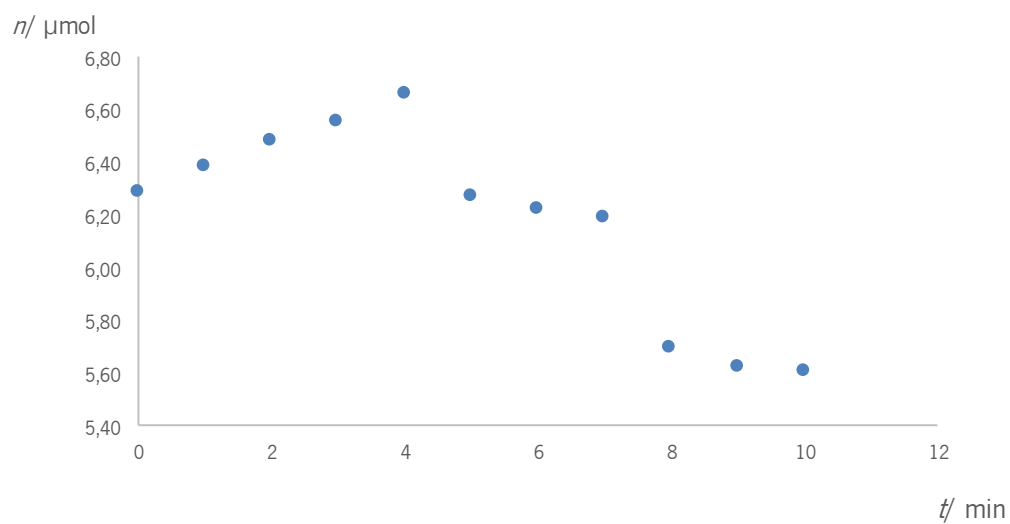


Figura A2: Atividade enzimática – Método Ciano acetamida.

ANEXO B: OTIMIZAÇÃO DO SUBSTRATO E TEMPERATURA

Na Figura B1 encontra-se o gráfico da atividade enzimática obtido quando a pectina foi dissolvida em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,5, na concentração de 5 g/L. Na Figura B2 encontra-se, apenas, a representação gráfica da fase linear, retirada da Figura B1.

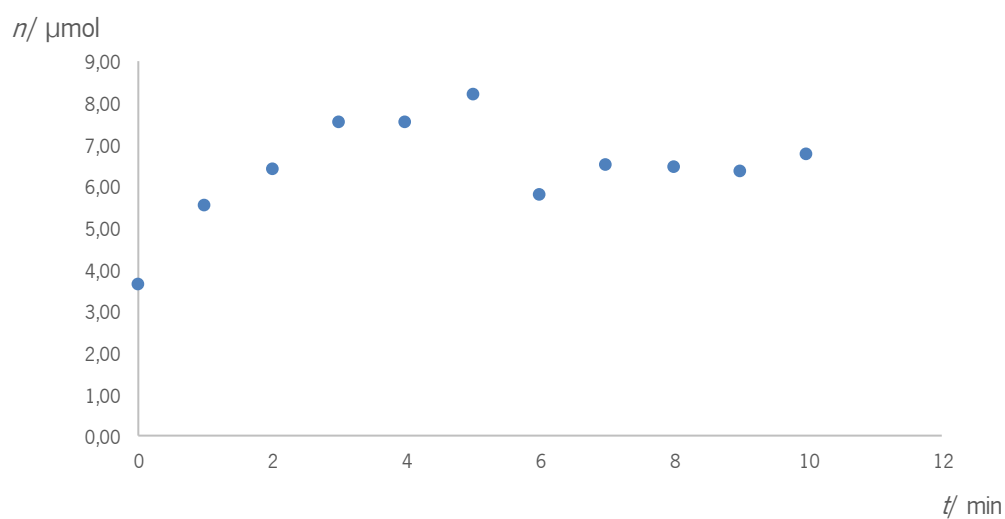


Figura B 1: Atividade enzimática – Tampão Fosfato 0,1 mol/L, pH 7,5 e pectina na concentração de 5 g/L.

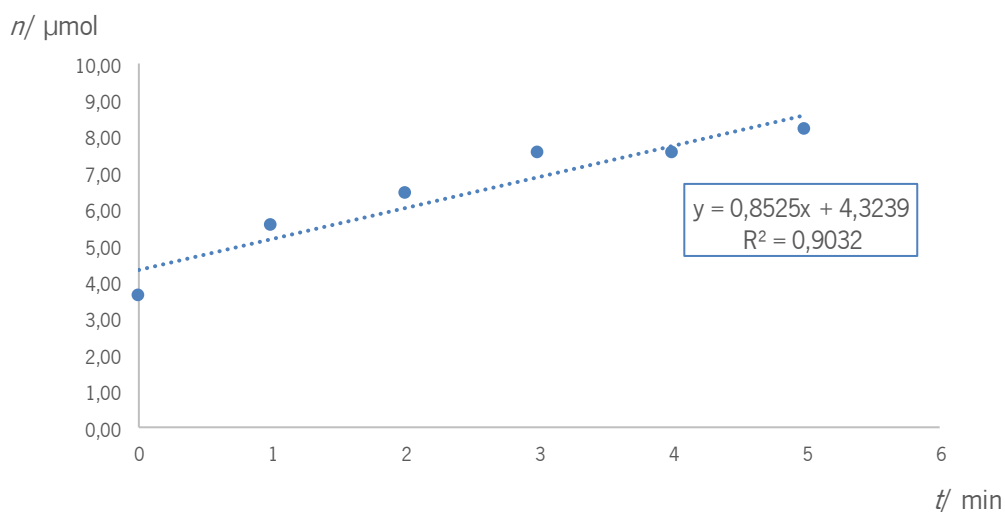


Figura B 2: Atividade enzimática – Fase linear – Tampão Fosfato 0,1 mol/L, pH 7,5 e pectina na concentração de 5 g/L.

Na Figura B3 encontra-se o gráfico da atividade enzimática obtido quando a pectina foi dissolvida em tampão citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 na concentração de 5 g/L. Na Figura B4 encontra-se, apenas, a representação gráfica da fase linear, retirada da Figura B3.

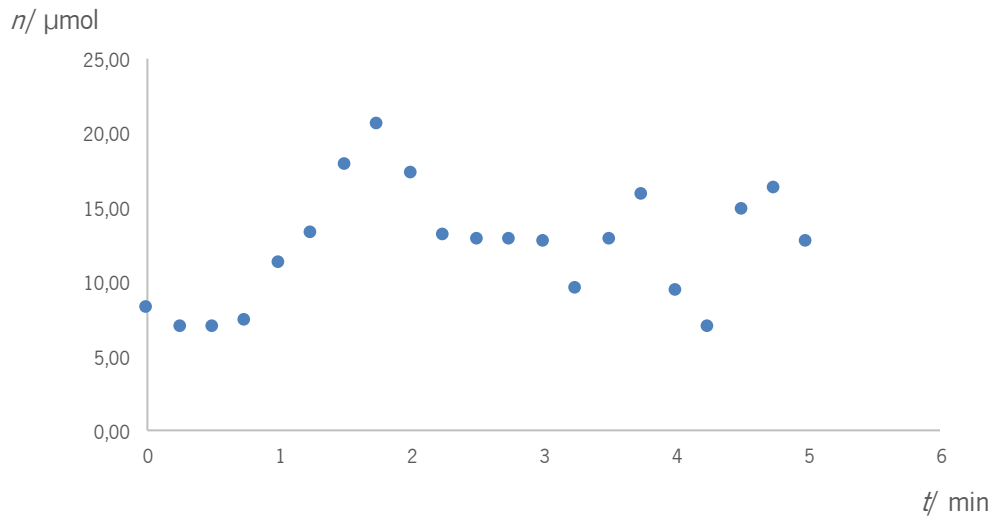


Figura B 3: Atividade enzimática – Tampão Citrato 0,1 mol/L pH 3,5 e pectina na concentração de 5 g/L.

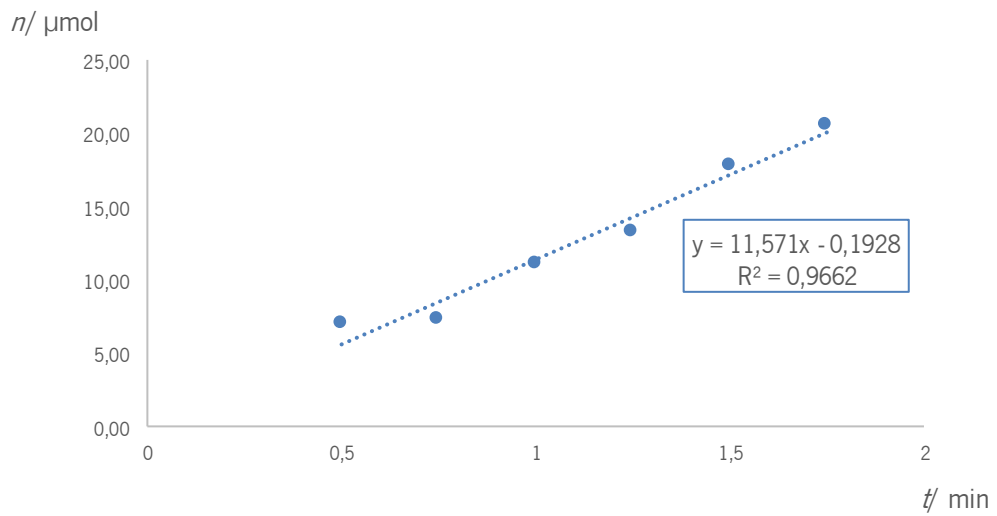


Figura B 4: Atividade enzimática – Fase linear – Tampão Citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 5 g/L.

Na Figura B5 encontra-se o gráfico da atividade enzimática obtido quando a concentração de pectina em tampão citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 foi de 5 g/L.

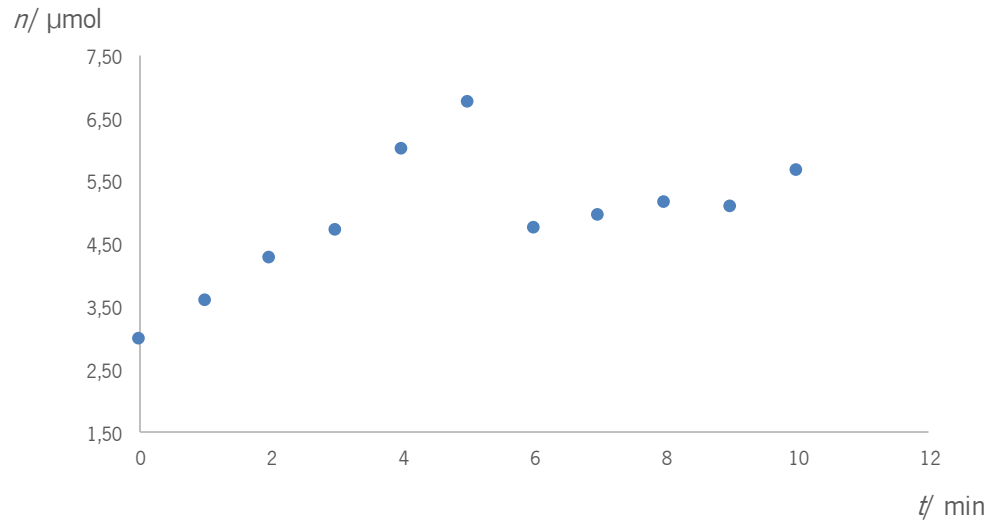


Figura B 5: Atividade enzimática – Tampão Citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 5 g/L.

Na Figura B6 encontra-se o gráfico da atividade enzimática obtido quando a concentração de pectina em tampão citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 foi de 15 g/L.

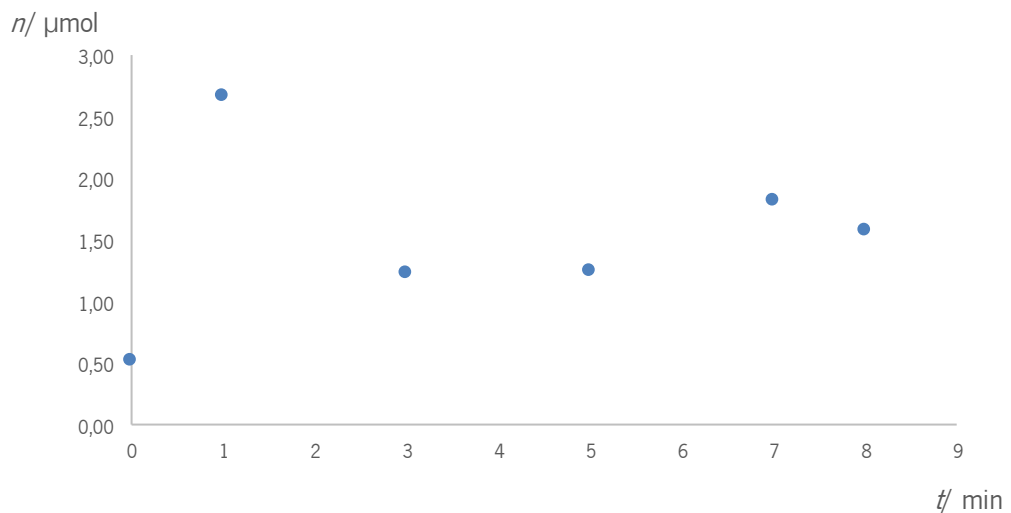


Figura B 6: Atividade enzimática – Tampão Citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 15 g/L.

Na Figura B7 encontra-se o gráfico da atividade enzimática obtido quando a concentração de pectina em tampão citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 foi de 25 g/L.

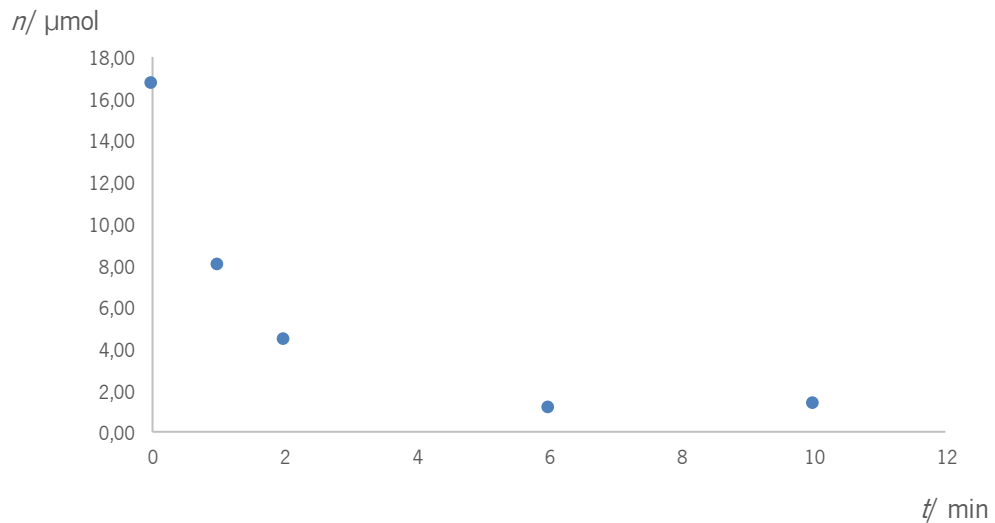


Figura B7: Atividade enzimática – Tampão Citrato 0,1 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 25 g/L.

Na Figura B8 encontra-se o gráfico da atividade enzimática obtido quando foi usado pectina a 2,5 g/L dissolvida em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 a 27 °C.

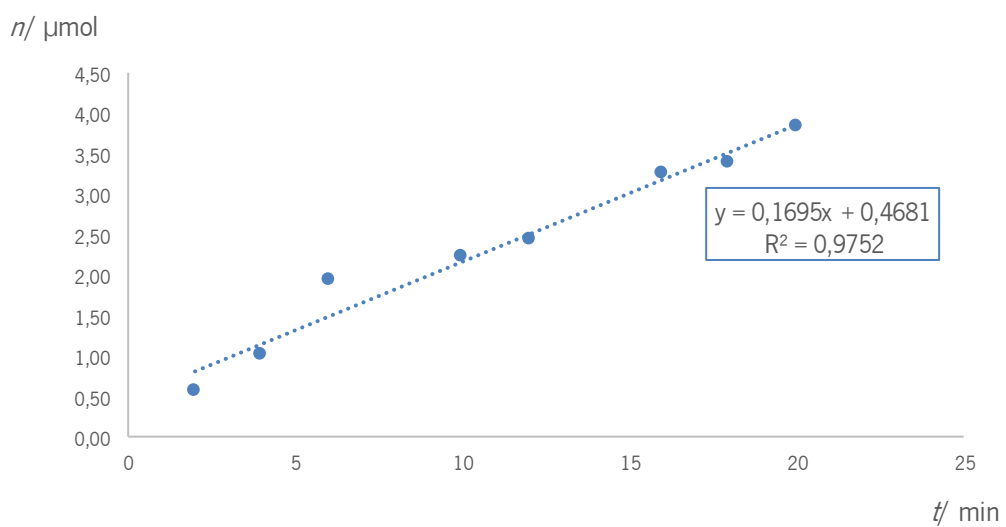


Figura B8: Atividade enzimática - Tampão Citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 2,5 g/L a 27 °C.

Na Figura B9 encontra-se o gráfico da atividade enzimática obtido quando foi usado pectina a 2,5 g/L dissolvida em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 a 12 °C.

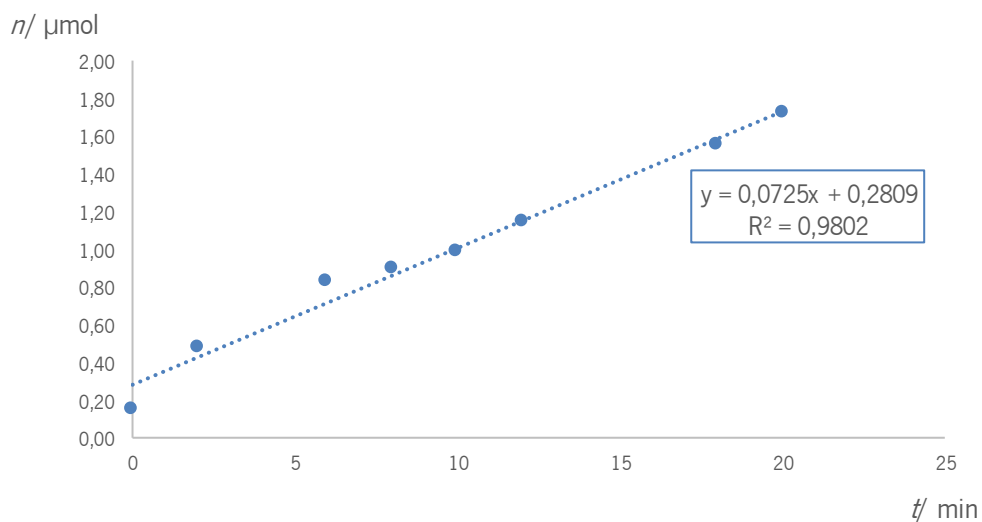


Figura B9: Atividade enzimática - Tampão Citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 2,5 g/L a 12 °C.

Na Figura B10 encontra-se o gráfico referente a análise da reprodutibilidade da atividade enzimática obtido sob as condições de tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5, pectina 2,5 g/L e temperatura de 27 °C.

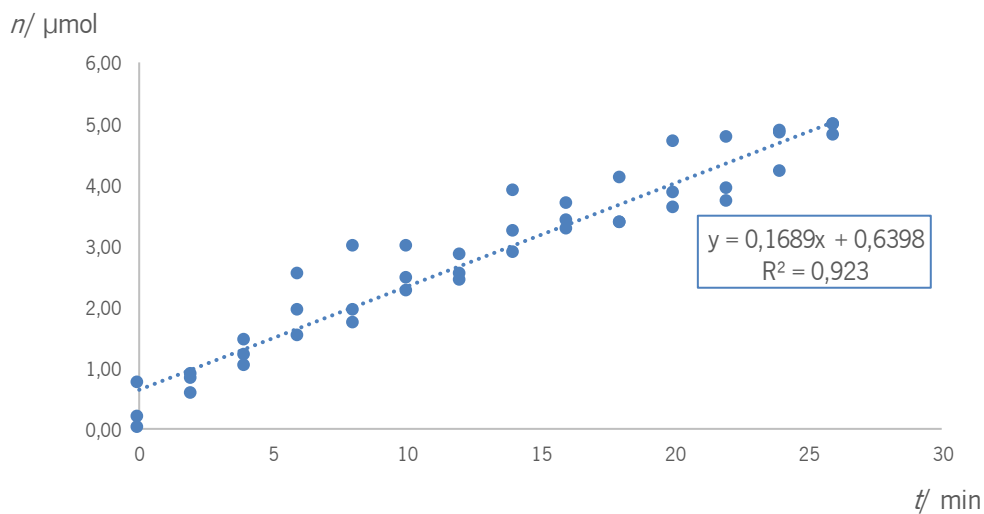


Figura B 10: Teste de reprodutibilidade da atividade enzimática - Tampão Citrato 0,05 mol/L pH 3,5 e pectina na concentração de 2,5 g/L a 27 °C.

Na Figura B11 encontra-se o gráfico referente a análise da reprodutibilidade da atividade enzimática obtido sob as condições de tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5, pectina 2,5 g/L e temperatura de 12 °C.

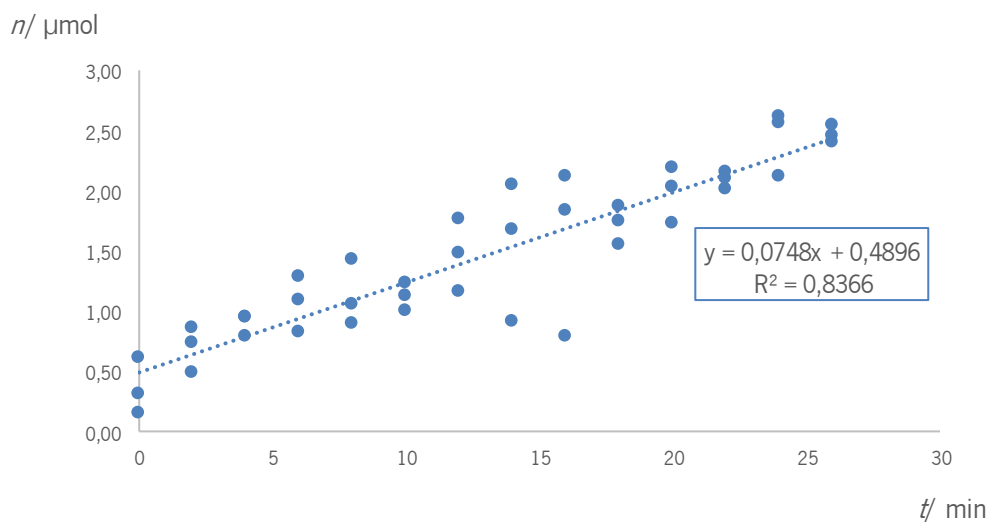


Figura B 11: Teste de reprodutibilidade da atividade enzimática - Tampão Citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 2,5 g/L a 12 °C.

ANEXO C: GRÁFICOS DE OBTENÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA – TESTES DA TEMPERATURA

A atividade enzimática da enzima PEC, em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5 e pectina na concentração de 2,5 g/L às diferentes condições de temperatura, pelo AC e AO, corresponde ao declive dos gráficos das Figuras C1 a C10.

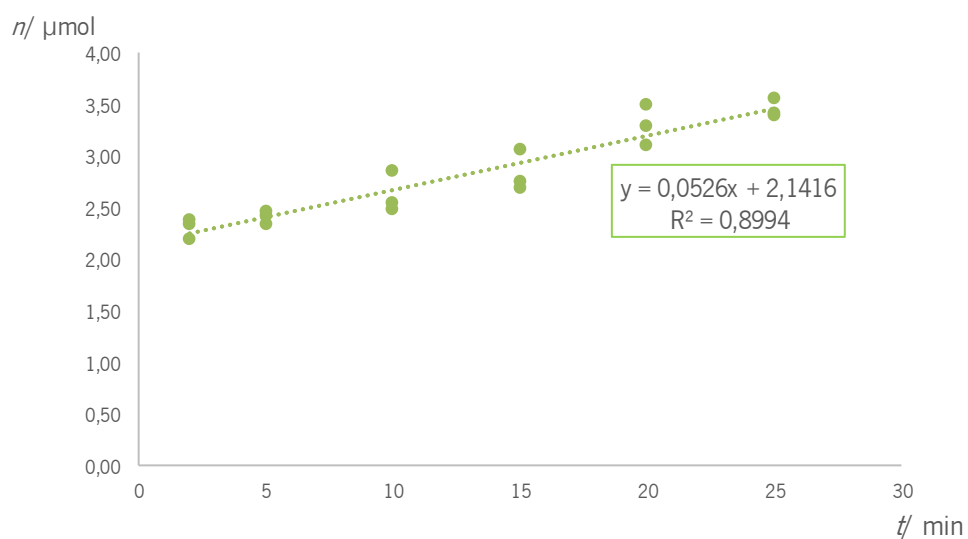


Figura C 1: Atividade enzimática pelo método do AC a 15 °C.

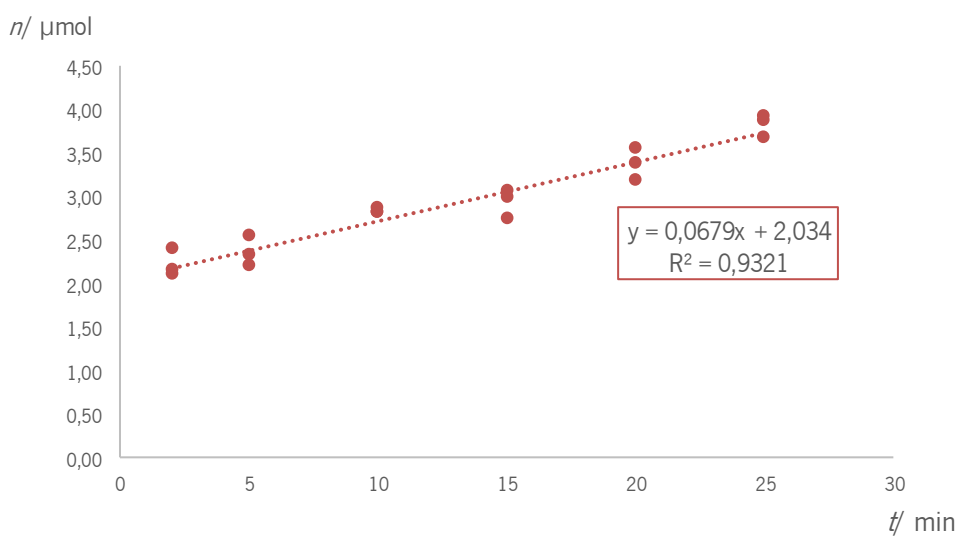


Figura C 2: Atividade enzimática pelo método do AO a 15 °C.

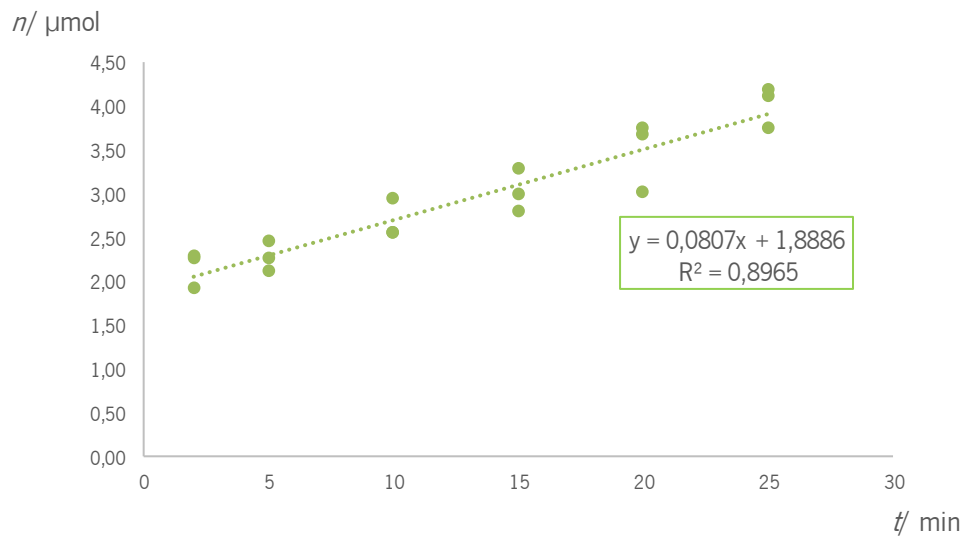


Figura C 3: Atividade enzimática pelo método do AC a 20 °C.

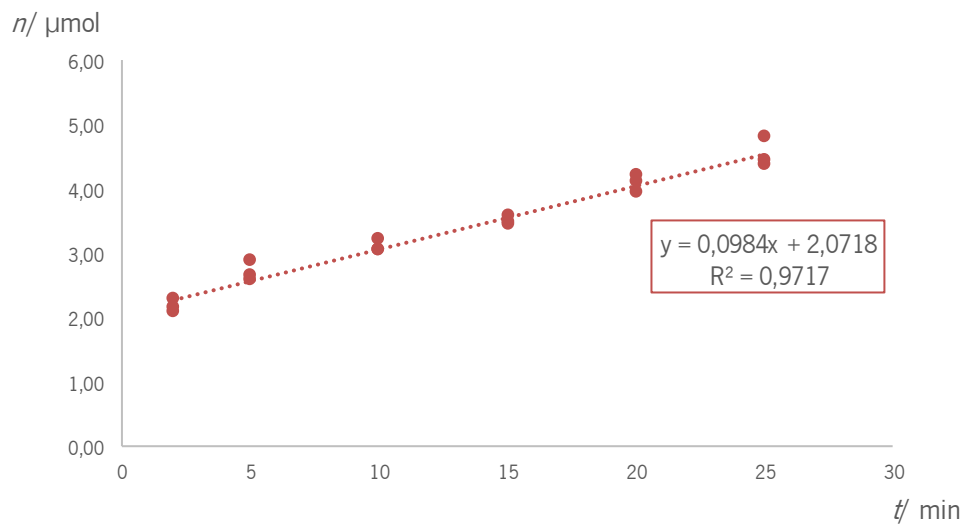


Figura C 4: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C.

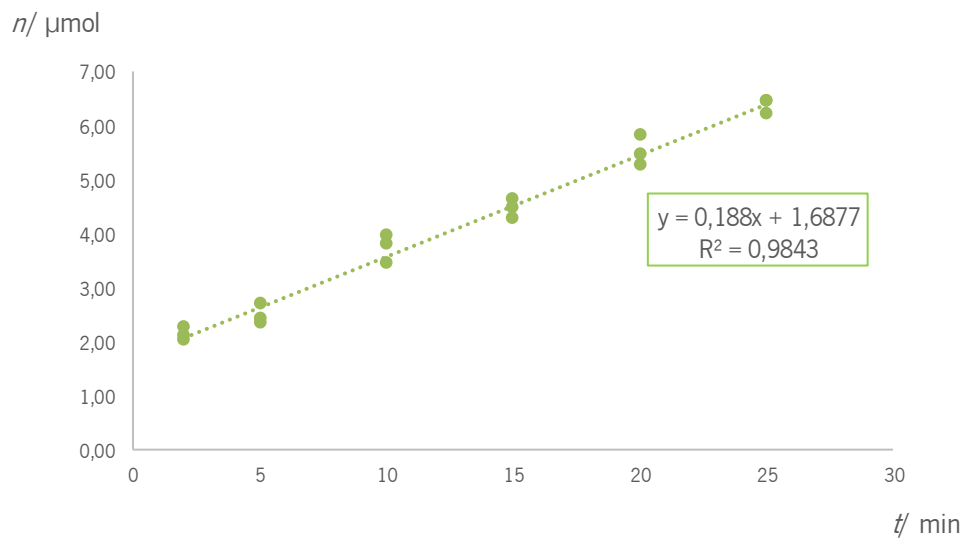


Figura C 5: Atividade enzimática pelo método do AC a 25 °C.

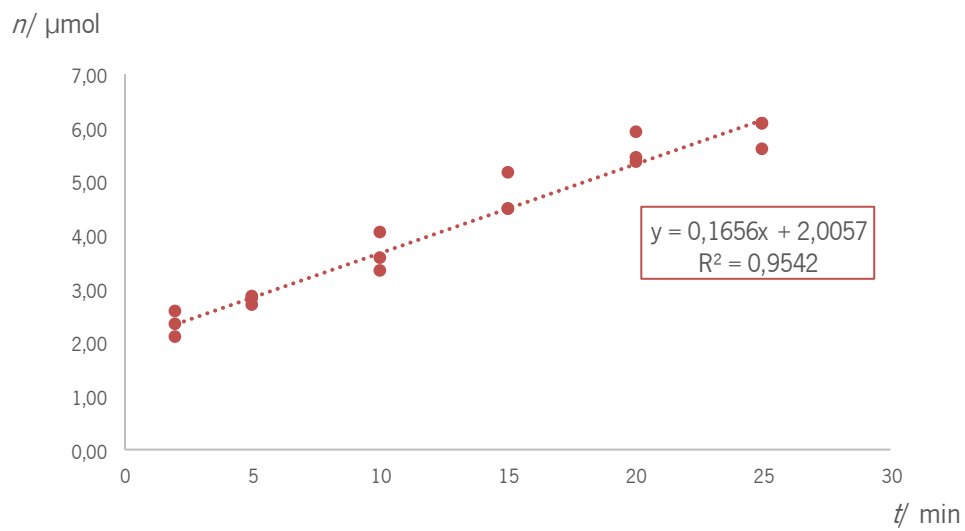


Figura C 6: Atividade enzimática pelo método do AO a 25 °C.

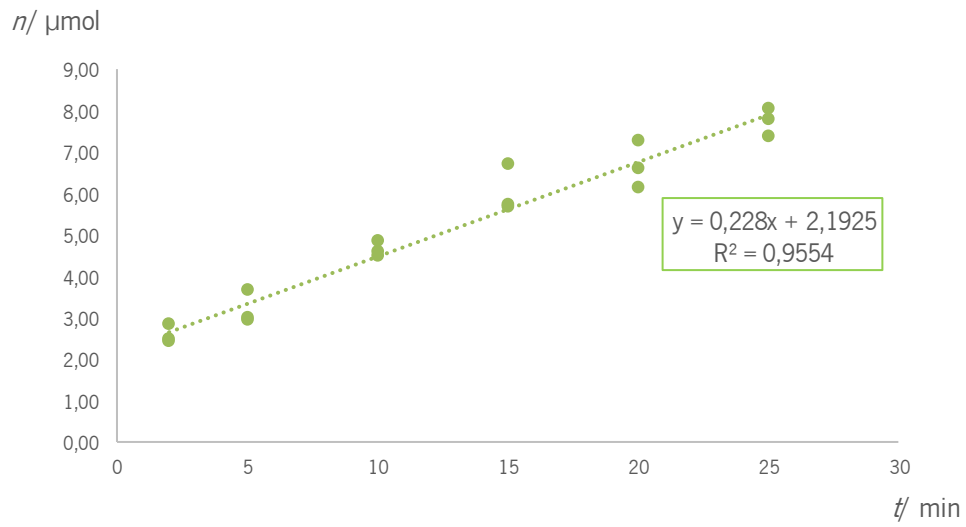


Figura C 7: Atividade enzimática pelo método do AC a 30 °C.

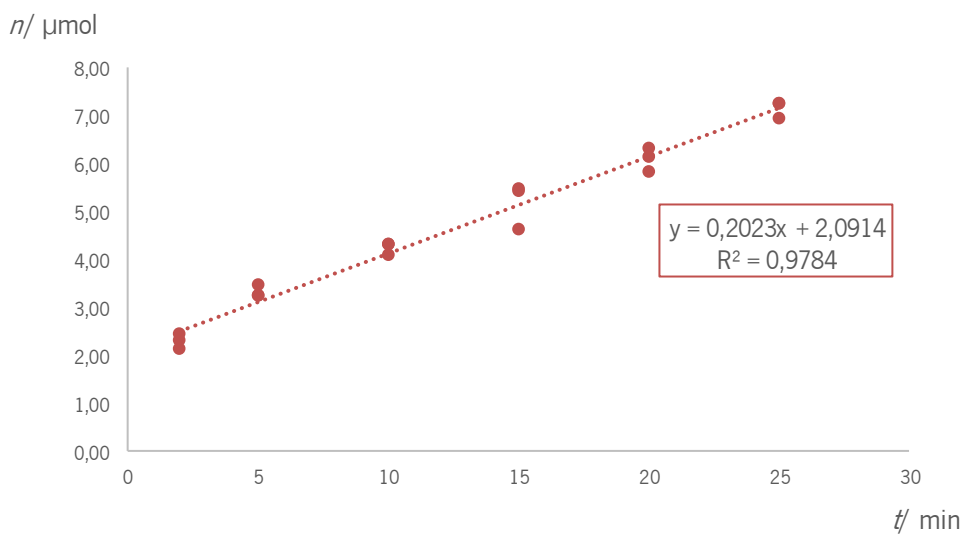


Figura C 8: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C.

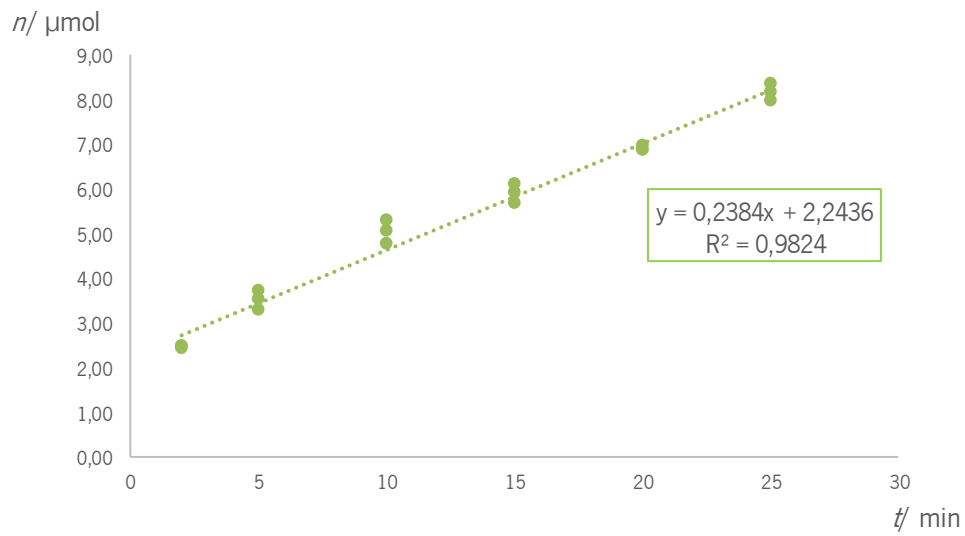


Figura C 9: Atividade enzimática pelo método do AC a 35 °C.

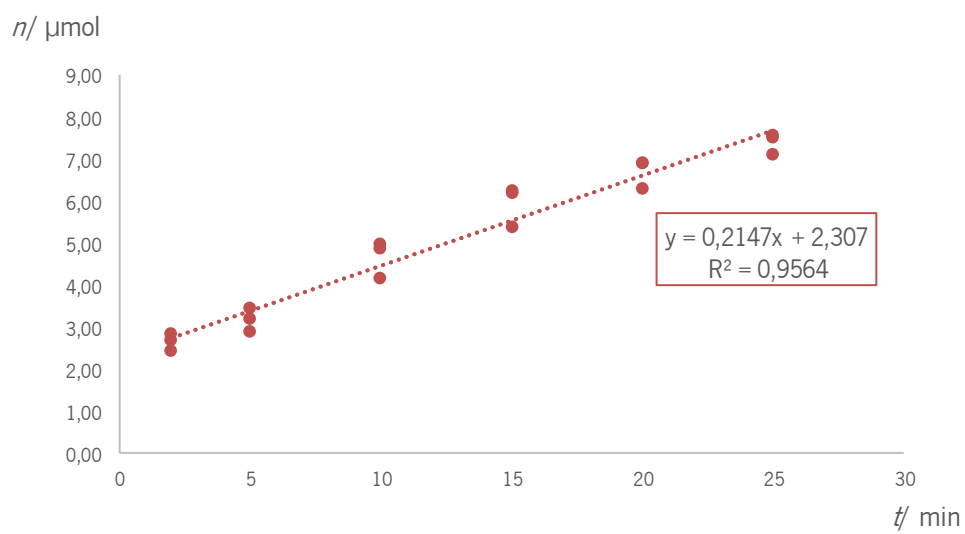


Figura C 10: Atividade enzimática pelo método do AO a 35 °C.

ANEXO D: GRÁFICOS DE OBTENÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA – TESTES DA FREQUÊNCIA

A atividade enzimática da enzima PEC, em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5, pectina na concentração de 2,5 g/L e a 20 °C, às diferentes condições de frequência, pelo AC e AO corresponde ao declive dos gráficos das Figuras D1 a D6.

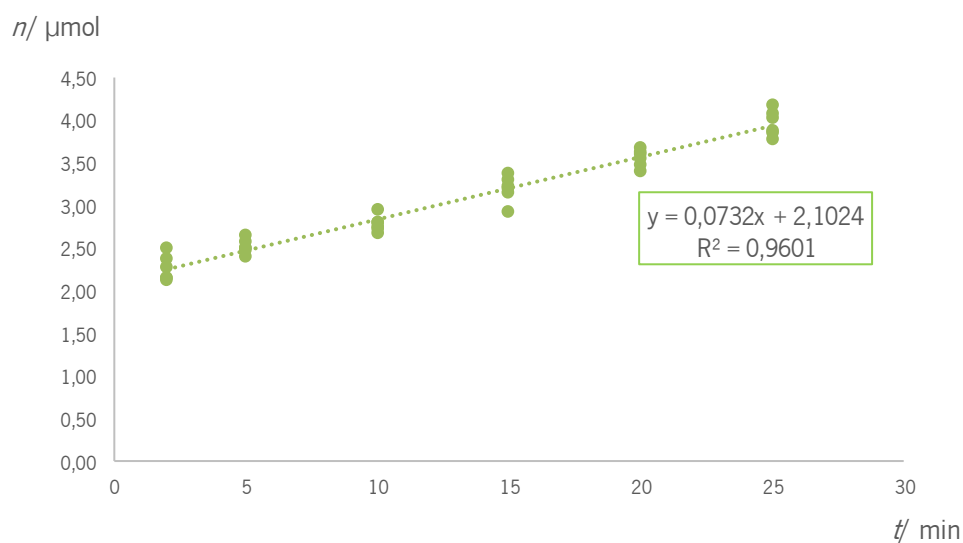


Figura D 1: Atividade enzimática pelo método do AC a 20 °C.

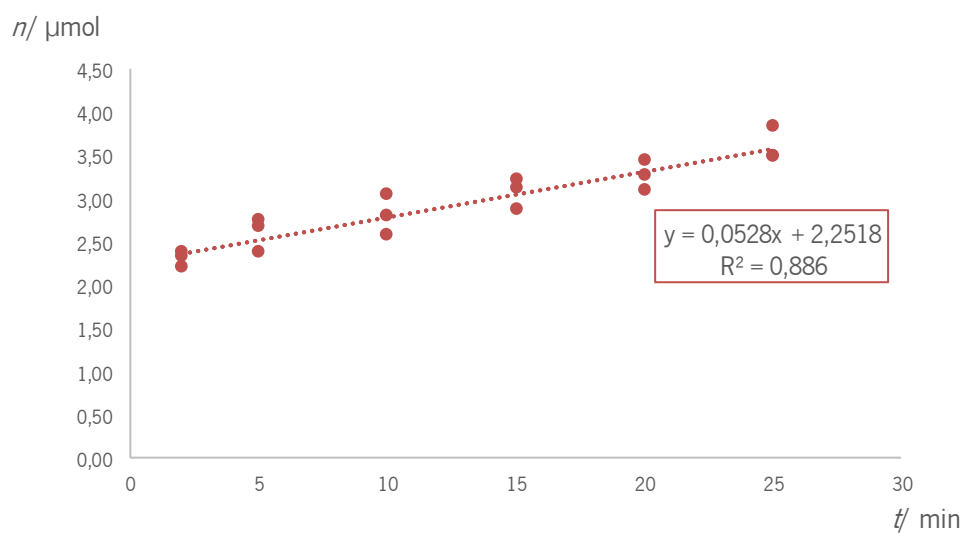


Figura D 2: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 7 V/cm e 50 Hz.

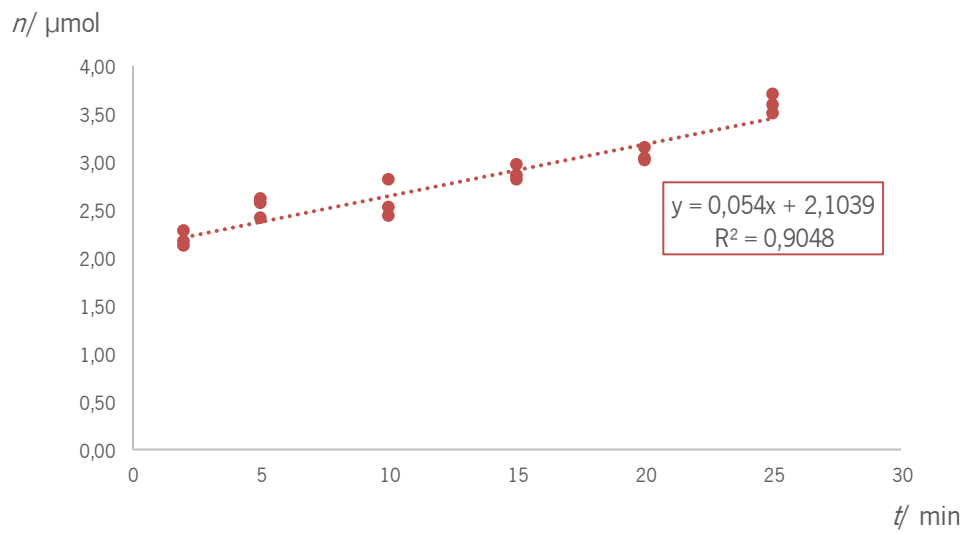


Figura D 3: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 7 V/cm e 100 Hz.

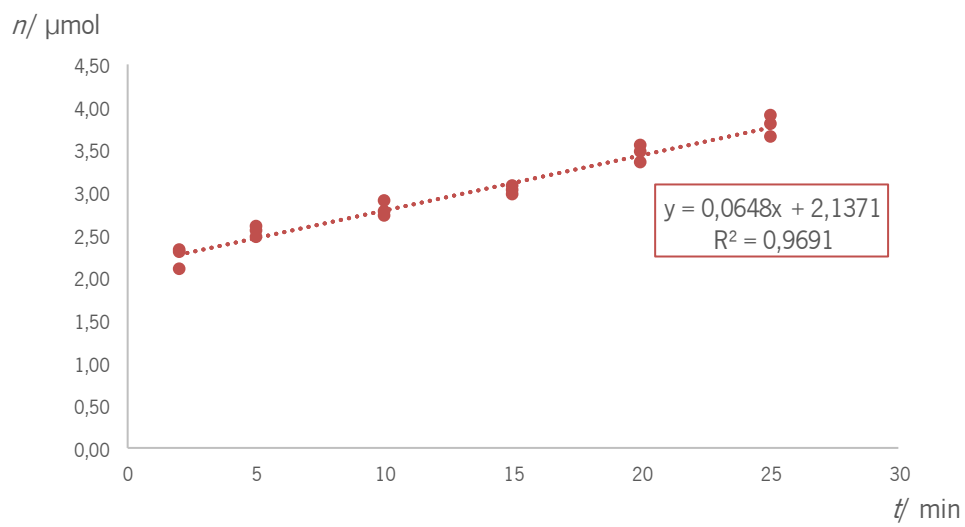


Figura D 4: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 7 V/cm e 500 Hz.

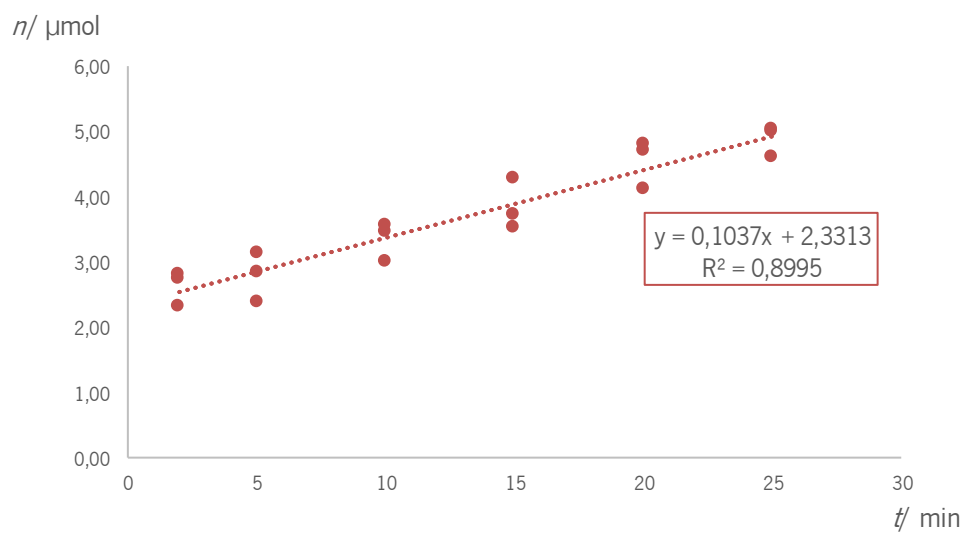


Figura D5: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 7 V/cm e 2000 Hz.

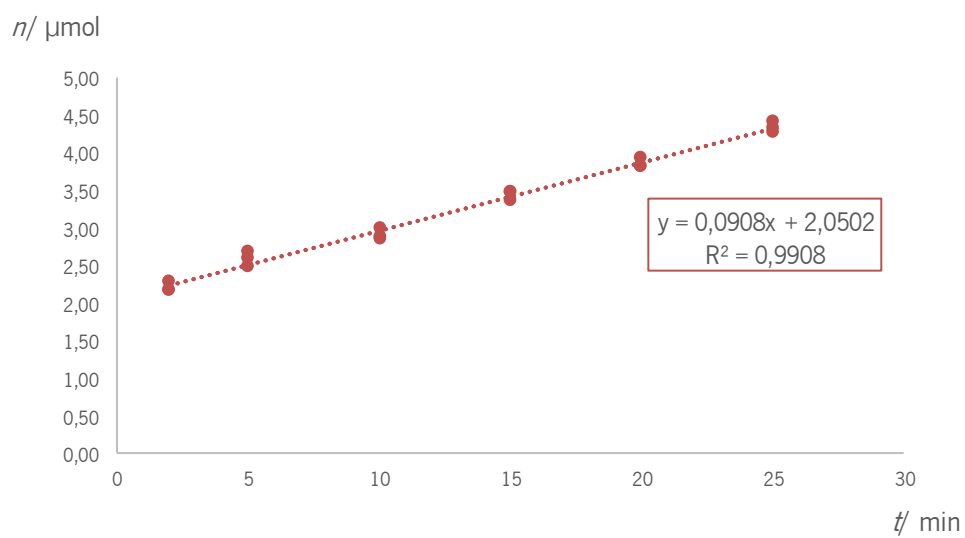


Figura D6: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 7 V/cm e 25000 Hz.

A atividade enzimática da enzima PEC, em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5, pectina na concentração de 2,5 g/L e a 30 °C, às diferentes condições de frequência, pelo AC e AO corresponde ao declive dos gráficos das Figuras D7 a D12.

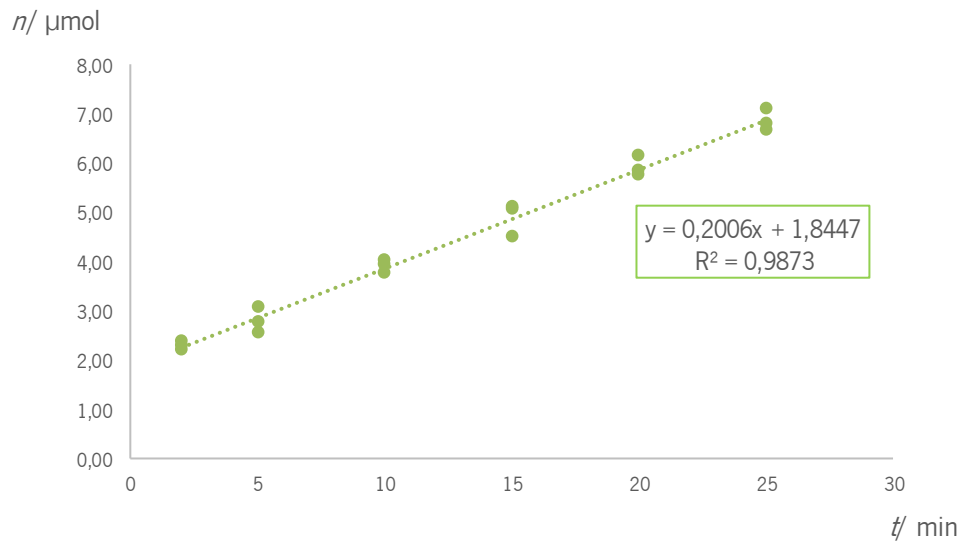


Figura D7: Atividade enzimática pelo método do AC a 30 °C.

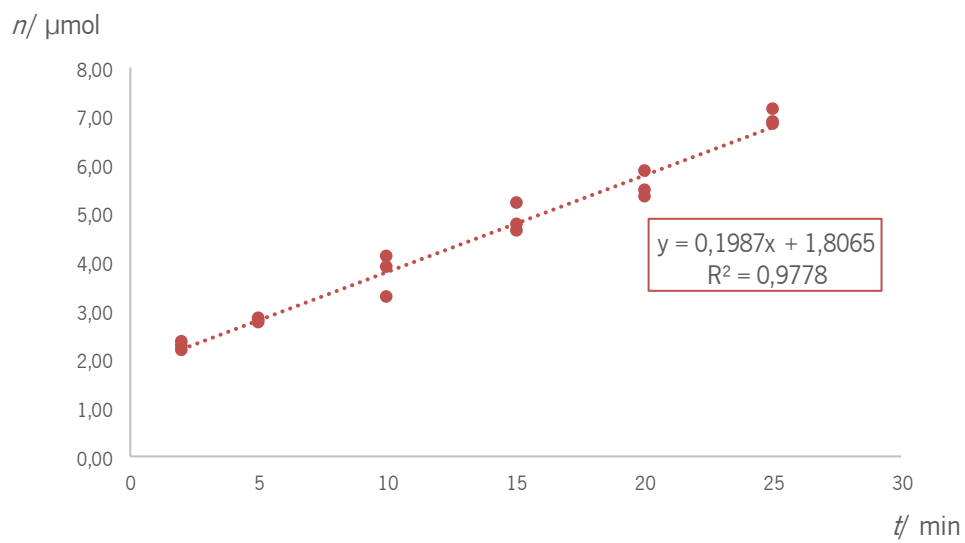


Figura D8: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 7 V/cm e 50 Hz.

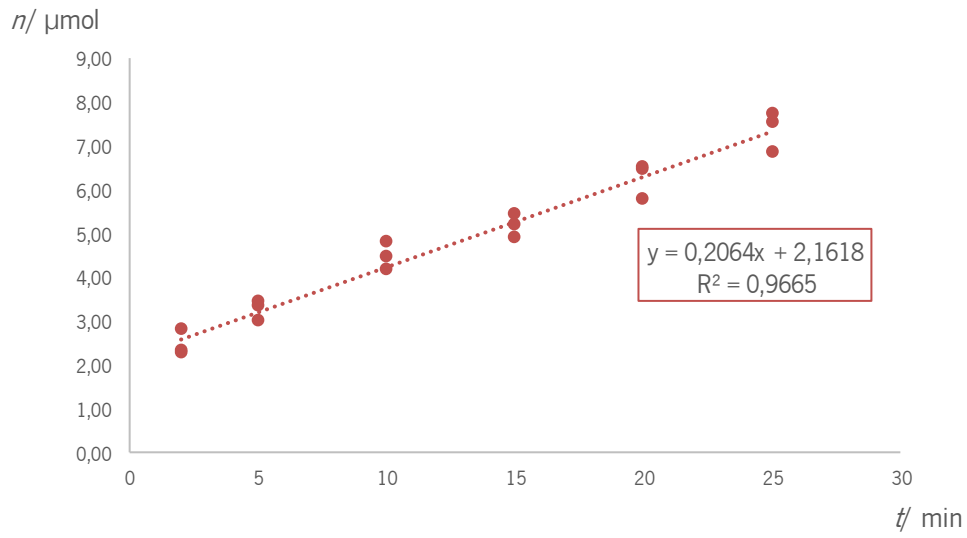


Figura D 9: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 7 V/cm e 100 Hz.

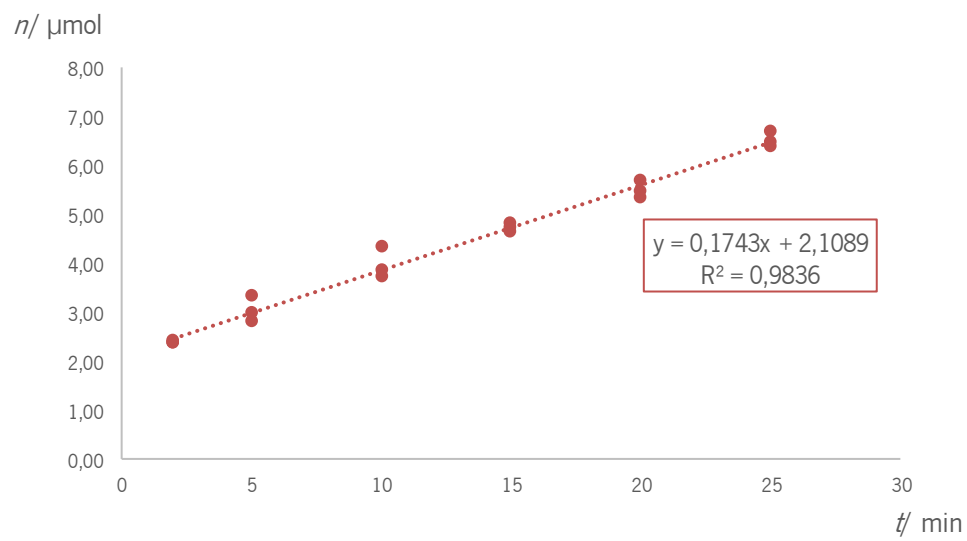


Figura D 10: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 7 V/cm e 500 Hz.

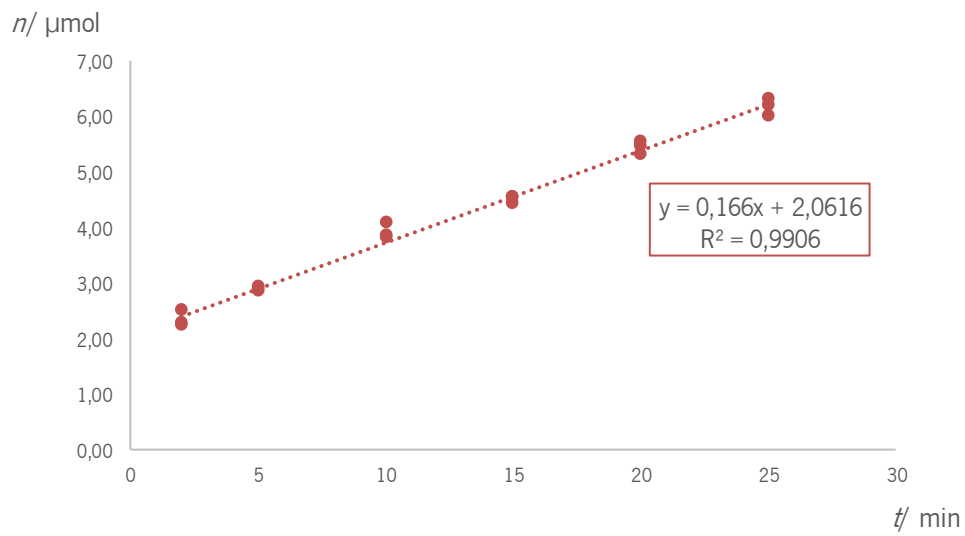


Figura D 11: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 7 V/cm e 2000 Hz.

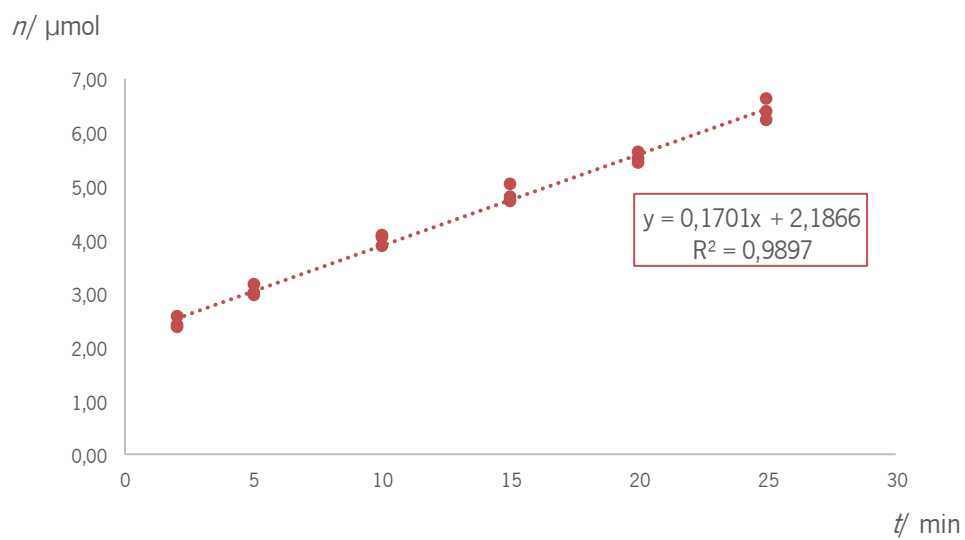


Figura D 12: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 7 V/cm e 25000 Hz.

ANEXO E: GRÁFICOS DE OBTENÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA – TESTES DO CAMPO ELÉTRICO

A atividade enzimática da enzima PEC, em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5, pectina na concentração de 2,5 g/L e a 20 °C, às diferentes condições de campo elétrico, pelo AC e AO corresponde ao declive dos gráficos das Figuras E1 a E5.

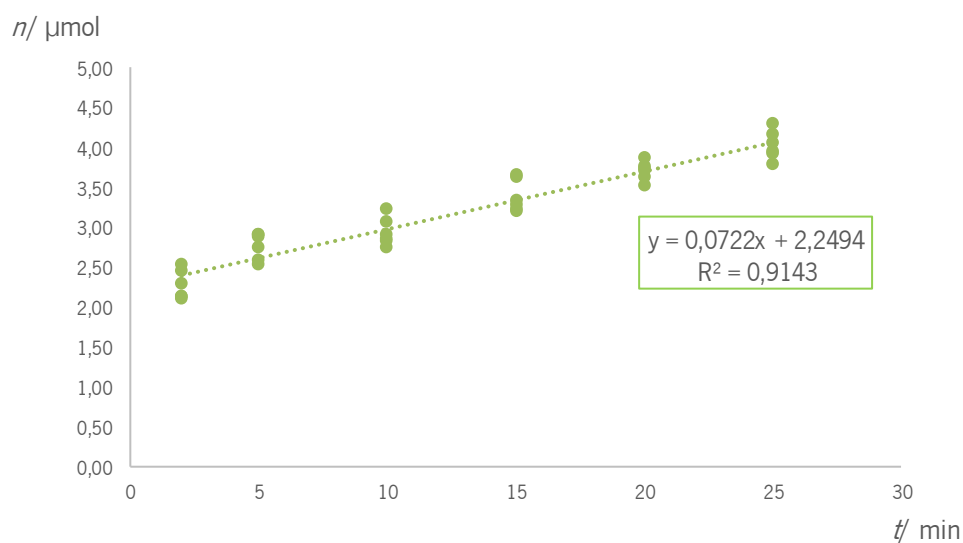


Figura E 1: Atividade enzimática pelo método do AC a 20 °C.

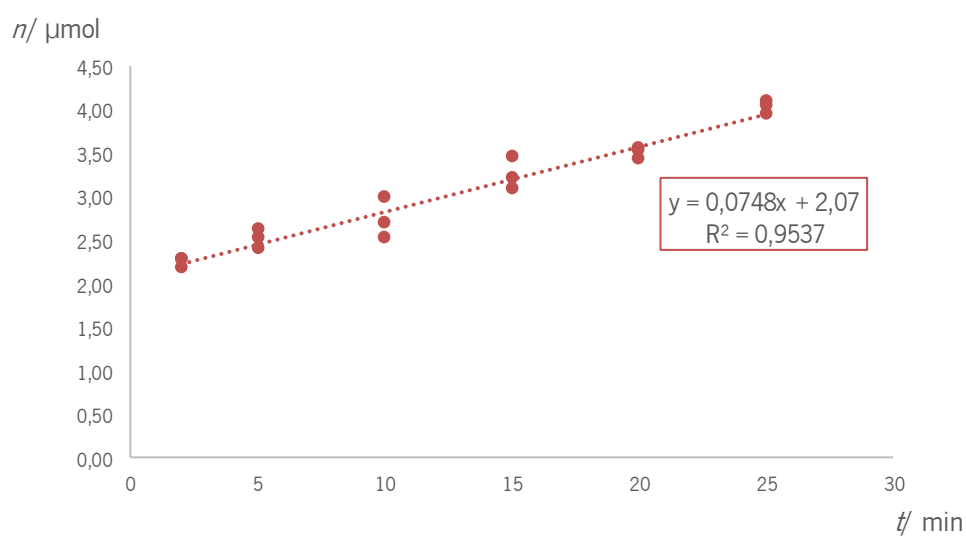


Figura E 2: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 2000 Hz e 0,2 V/cm.

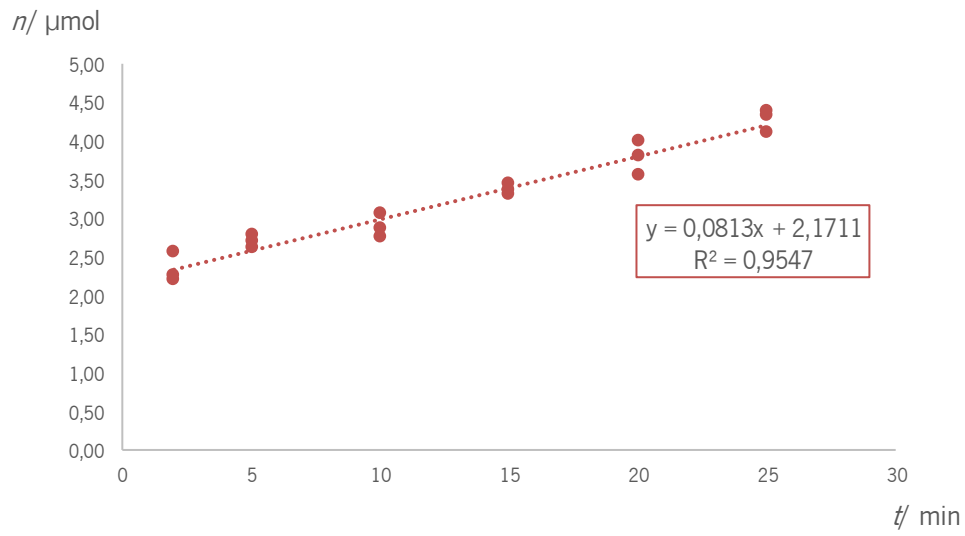


Figura E 3: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 2000 Hz e 2 V/cm.

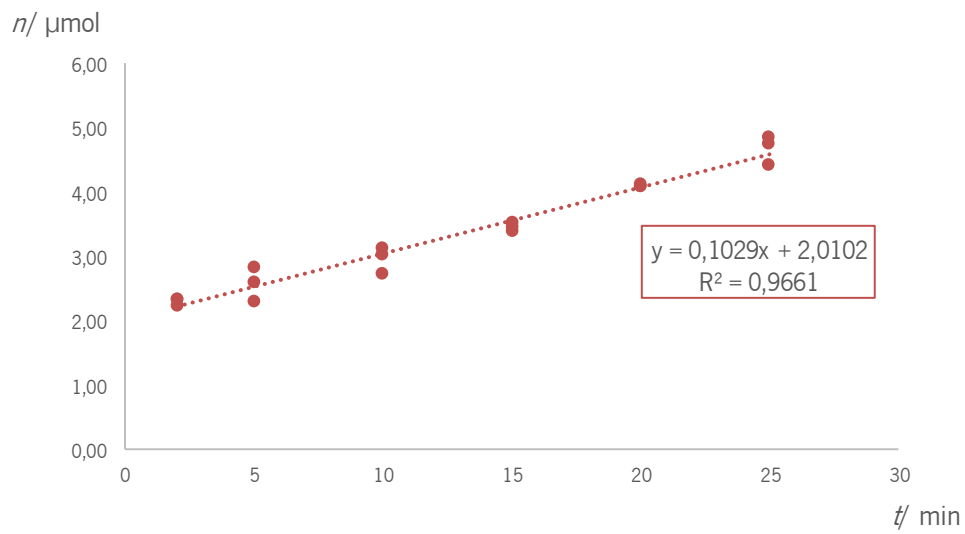


Figura E 4: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 2000 Hz e 7 V/cm.

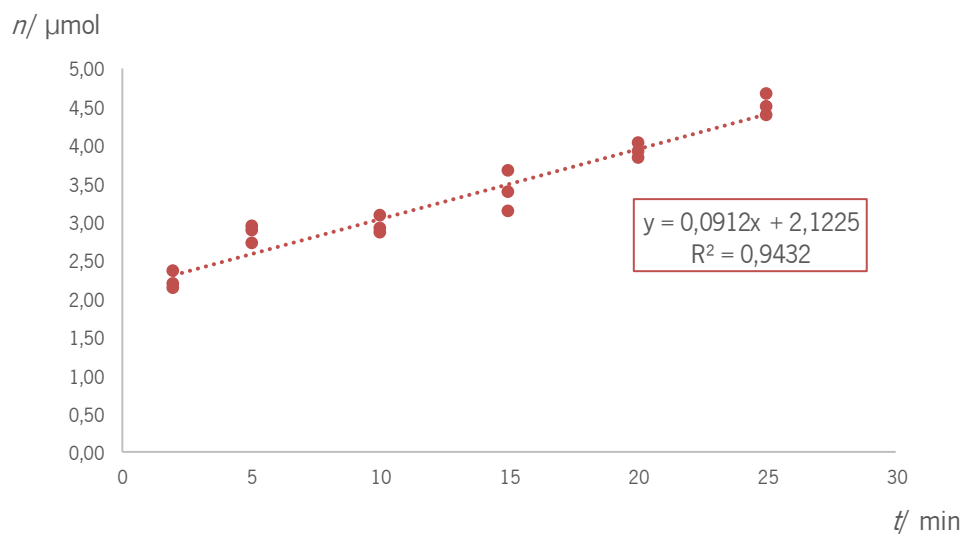


Figura E 5: Atividade enzimática pelo método do AO a 20 °C, 2000 Hz e 14 V/cm.

A atividade enzimática da enzima PEC, em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,5, pectina na concentração de 2,5 g/L e a 30 °C, às diferentes condições de campo elétrico, pelo AC e AO corresponde ao declive dos gráficos das Figuras E6 a E10.

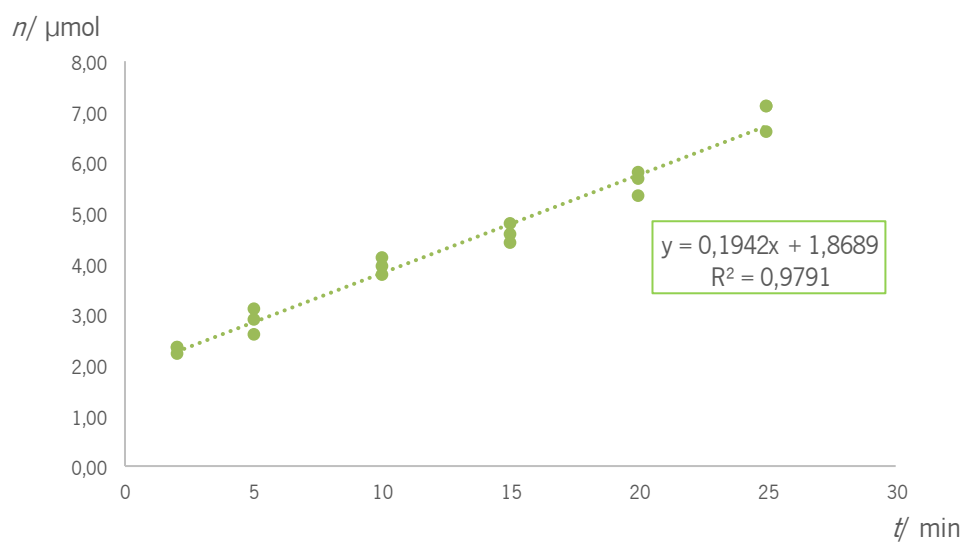


Figura E 6: Atividade enzimática pelo método do AC a 30 °C.

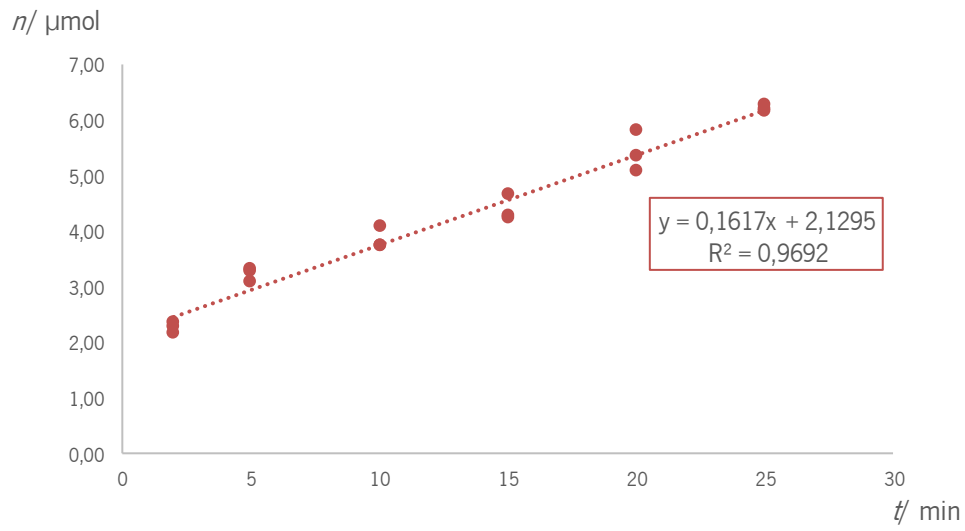


Figura E 7: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 100 Hz e 0,2 V/cm.

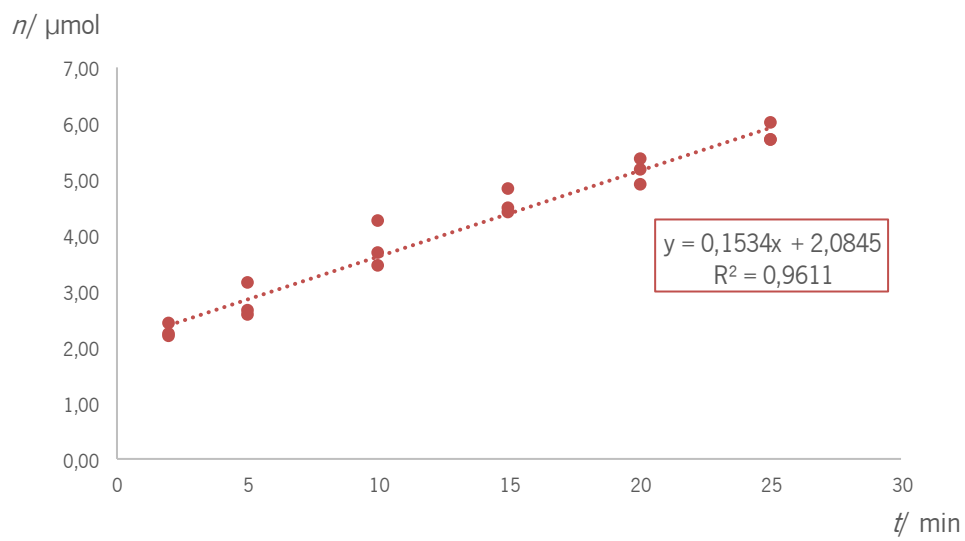


Figura E 8: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 100 Hz e 2 V/cm.

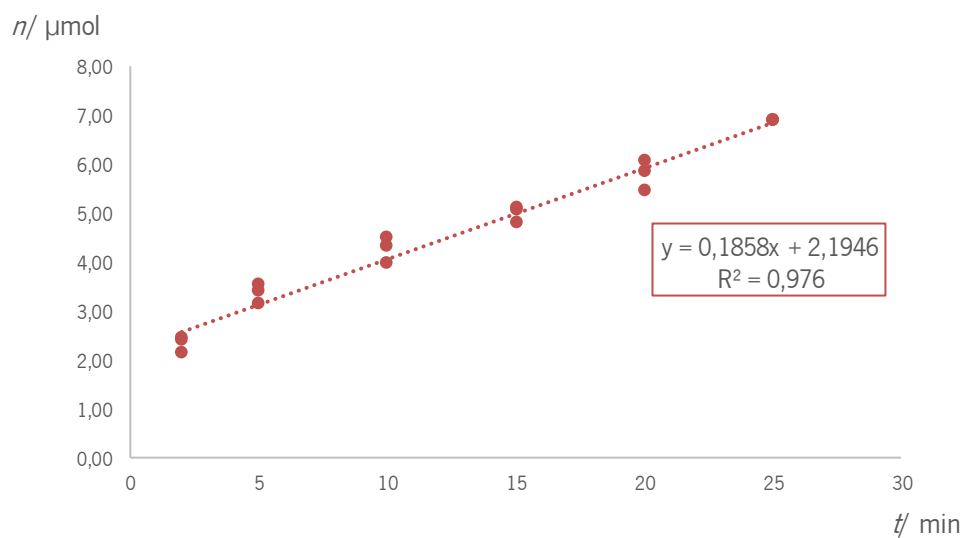


Figura E 9: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 100 Hz e 7 V/cm.

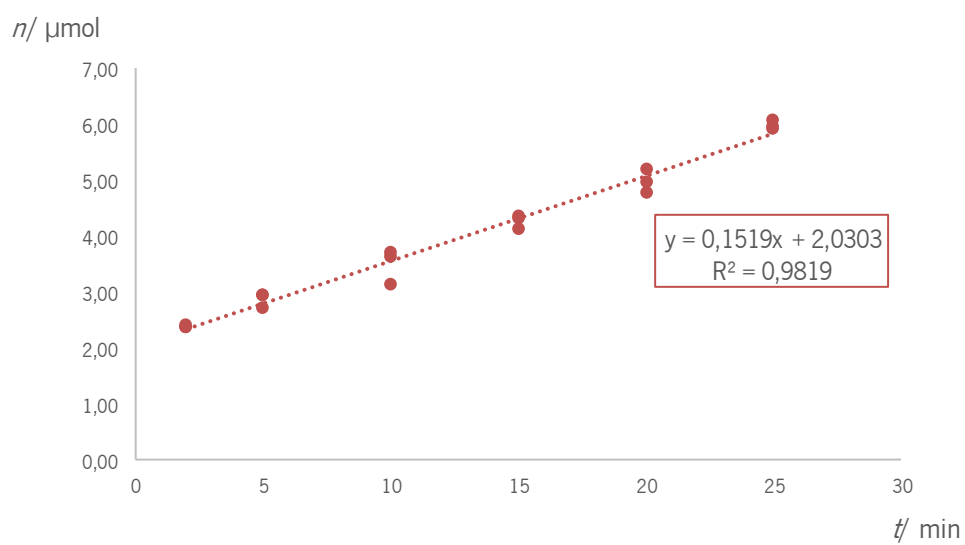


Figura E 10: Atividade enzimática pelo método do AO a 30 °C, 100 Hz e 14 V/cm.

ANEXO F: CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO MÉTODO DE DNS

Ao longo do trabalho laboratorial foi necessário preparar quatro vezes o reagente de DNS, o que implicou a realização das respectivas calibrações apresentadas nas Figuras F1, F2, F3 e F4.

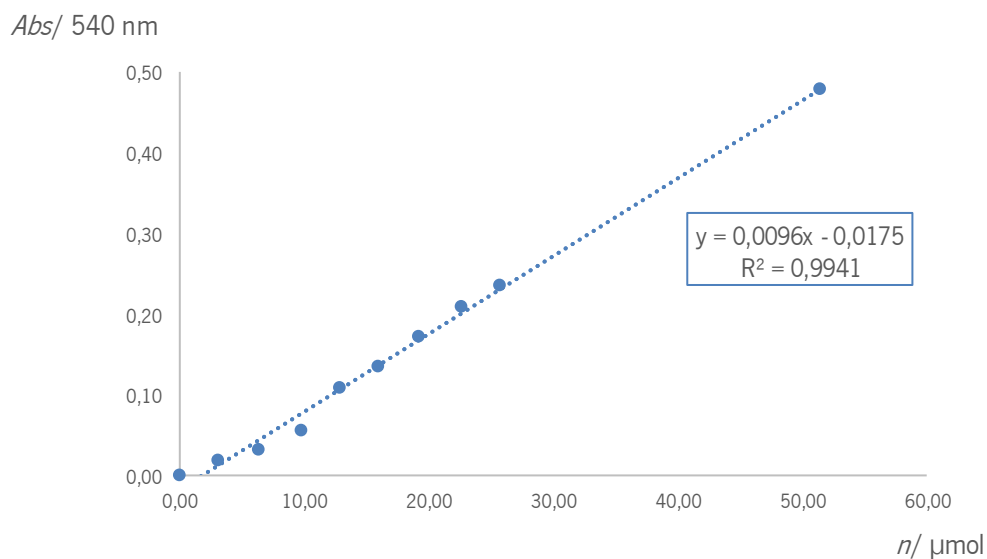


Figura F 1: Curva de calibração do DNS de Janeiro - Março.

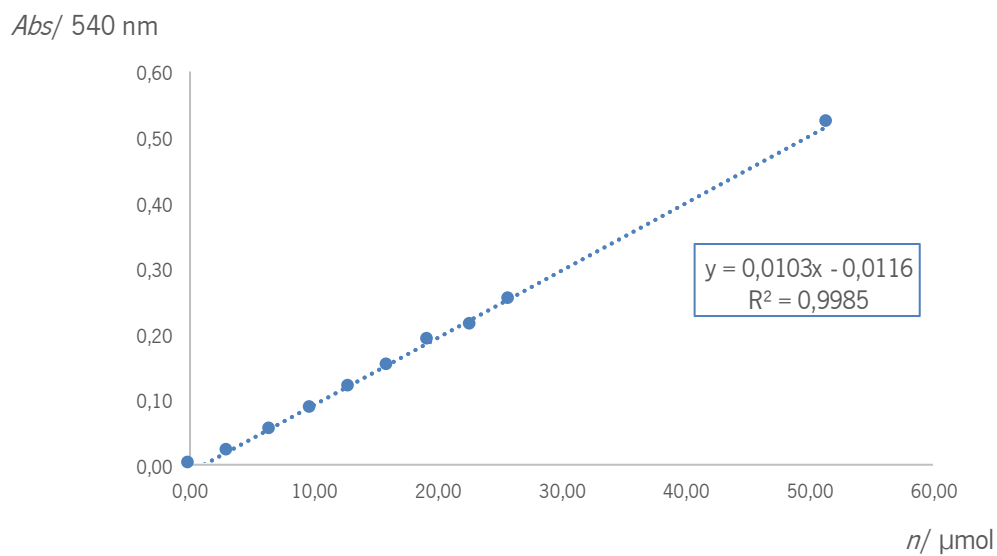


Figura F 2: Curva de calibração do DNS de Maio - Junho.

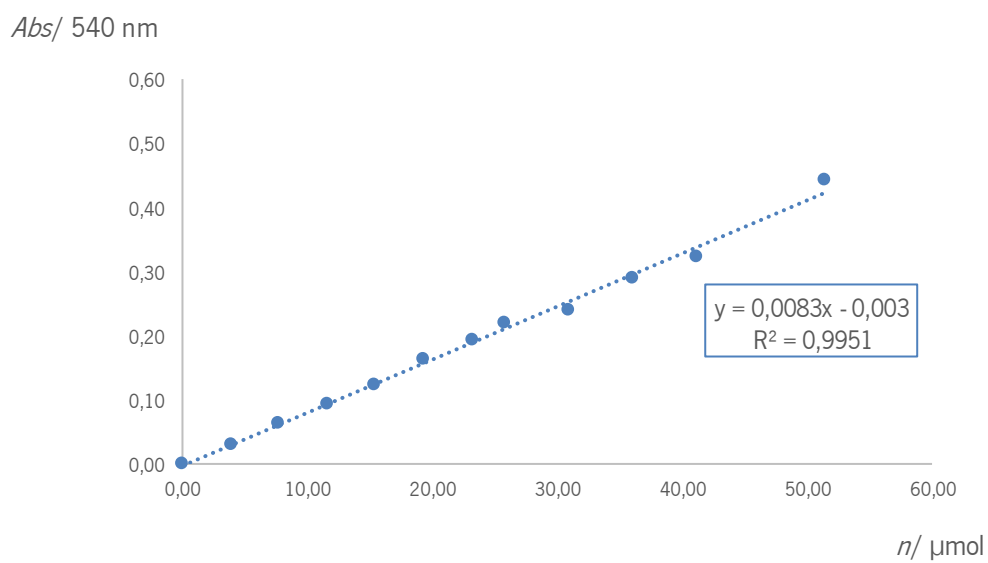


Figura F 3: Curva de calibração do DNS de Agosto.

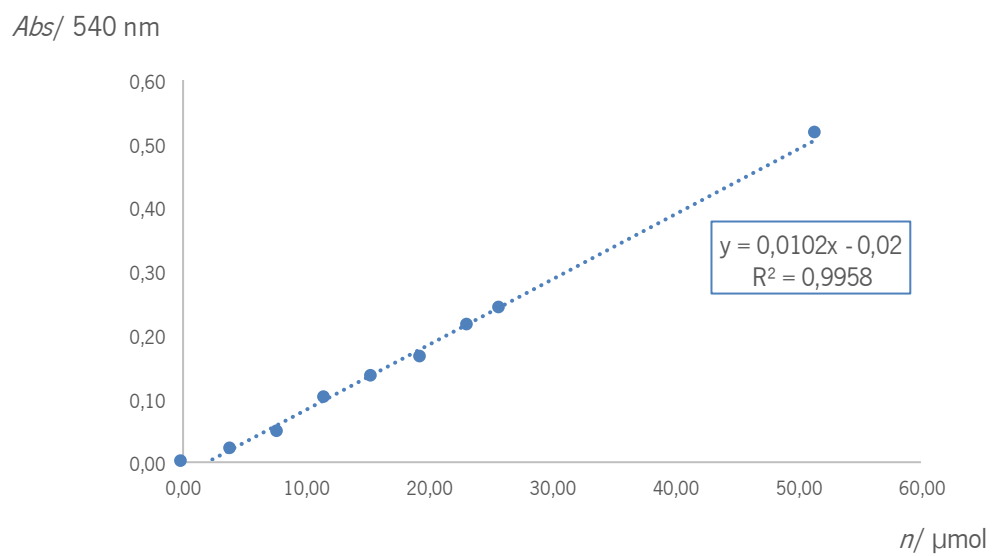


Figura F 4: Curva de calibração do DNS de Setembro - Outubro.

ANEXO G: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MÉTODO DA CIANO ACETAMIDA

Ao longo do trabalho laboratorial foi necessário preparar duas vezes os reagentes necessários para a realização do método da ciano acetamida, o que implicou a realização das respectivas calibrações apresentadas nas Figuras G1 e G2.

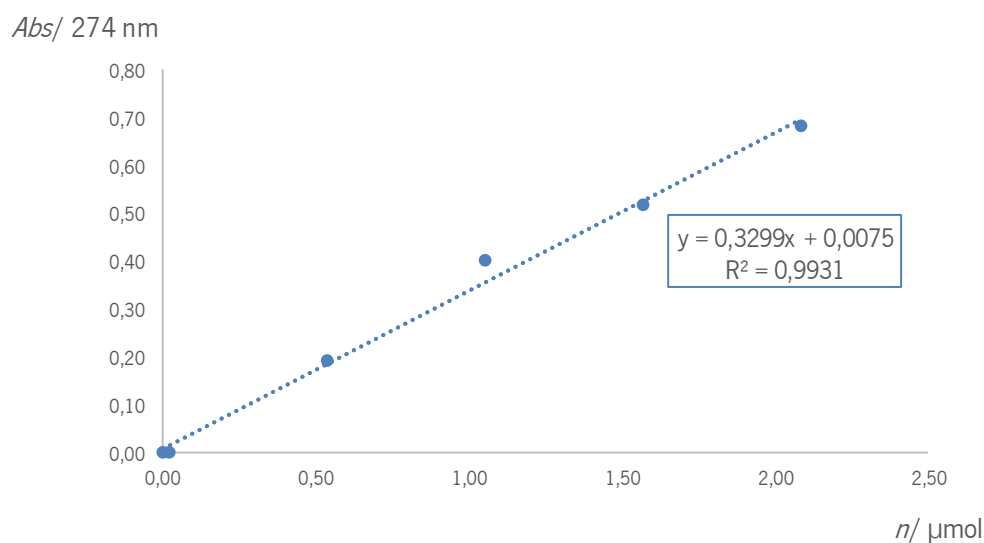


Figura G 1: Curva de calibração do método da ciano acetamida de Janeiro - Março.

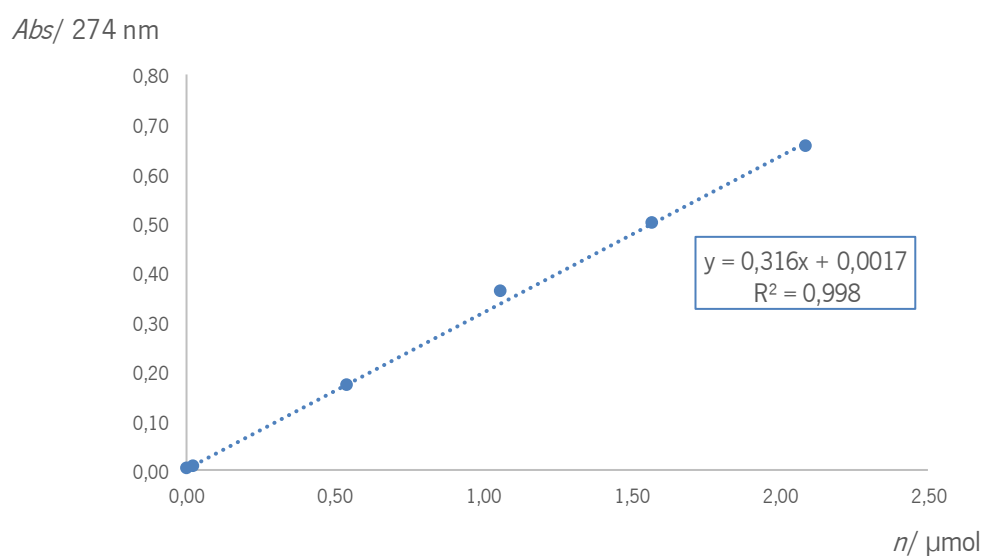


Figura G 2: Curva de calibração do método da ciano acetamida de Outubro.

ANEXO H: CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS

As metodologias de análise de vinhos descritos na secção 3.1 foram usadas (de forma independente ao objetivo principal deste trabalho) para caracterizar alguns vinhos antes do respetivo engarrafamento e comercialização na empresa de estágio.

Na Tabela H1, H2 e H3 encontram-se as análises realizadas a três vinhos diferentes – um vinho branco frutado, um vinho branco maduro e um vinho rosé maduro.

Tabela H 1: Caracterização de um vinho branco frutado

Origem: Lote FRU 9.5 B 0287

Tipo Vinho: Branco

Depósito: 2

Volume: 9300 L

Teor alcoólico (% v/v)

T = 92,4 °C

➤ 9,1 %

Calibração

T = 99,8 °C

Acidez Total (g ácido tartárico/L)

V (hidróxido de sódio) = 8,6 mL

AT = 8,6 x 0,75 = 6,45 g/L

Acidez volátil (g ácido acético/L)

V (hidróxido de sódio) = 1,1 mL

Fator correção = (45/32) x 0,1 = 0,14 g/L

AV = 1,1 x 0,6 - 0,14 = 0,52 g/L

Dióxido de enxofre livre (mg/L)

SO₂ livre = 45 mg/L

Dióxido de enxofre total (mg/L)

SO₂ total = 119 mg/L

pH

3,14

Tabela H 2: Caracterização de um vinho branco maduro

Origem: M13 B 0295

Tipo Vinho: Branco

Depósito: 3

Volume: 8500 L

Teor alcoólico (% v/v)

T = 90,8 °C

➤ 12,7 %

Calibração

T = 99,7 °C

Acidez Total (g ácido tartárico/L)

V (hidróxido de sódio) = 7,6 mL

AT = 7,6 x 0,75 = 5,7 g/L

Acidez volátil (g ácido acético/L)

V (hidróxido de sódio) = 1,1 mL

Fator de correção = (66/32) x 0,1 = 0,21 g/L

AV = 1,1 x 0,6 - 0,21 = 0,45 g/L

Dióxido de enxofre livre (mg/L)

SO₂ livre = 66 mg/L

Dióxido de enxofre total (mg/L)

SO₂ total = 112 mg/L

pH

3,24

Tabela H 3: Caracterização de um vinho rosé maduro

Origem: M 10,5 R 0293

Tipo Vinho: Rosé Meio Seco

Depósito: 2

Volume: 2200 L

Teor alcoólico (% v/v)

T = 91,9 °C

➤ 10,6 %

Calibração

T = 99,7 °C

Acidez Total (g ácido tartárico/L)

V (hidróxido de sódio) = 8,8 mL

AT = 8,8 x 0,75 = 6,6 g/L

Acidez volátil (g ácido acético/L)

V (hidróxido de sódio) = 1,6 mL

Fator de correção = (82/32) x 0,1 = 0,26 g/L

AV = 1,6 x 0,6 - 0,26 = 0,7 g/L

Dióxido de enxofre livre (mg/L)

SO₂ livre = 82 mg/L

Dióxido de enxofre total (mg/L)

SO₂ total = 114 mg/L

pH

3,18