

**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Ana Rita Peixoto Santos

**Estabilização das Leveduras do Mosto  
de Uvas Através da Tecnologia  
de Aquecimento Óhmico**

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

Trabalho efetuado sob a orientação do  
**Doutor Ricardo Nuno Correia Pereira**  
do  
**Professor Doutor António Augusto Martins de Oliveira  
Soares Vicente**  
e do  
**Engenheiro Guilherme Paulo Dias de Castro Pereira**

outubro de 2019

## **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-NãoComercial-SemDerivações**  
**CC BY-NC-ND**

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

## **Agradecimentos**

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Ao Doutor Ricardo Pereira, por toda a orientação, dedicação, empenho, disponibilidade e ajuda incansáveis, tanto no trabalho prático como no esclarecimento de questões teóricas ao longo de todo o projeto.

Ao Professor António Vicente, por toda a atenção e consideração dadas não só a mim como a todos os membros do laboratório, e por criar também condições de trabalho modelares – a quem também devo agradecer pela minha inserção no Laboratório de Indústria e Processo durante o período de estágio.

Ao Engenheiro Guilherme Pereira, pela conceção deste projeto e posterior criação desta oportunidade de trabalho, igualmente pelo seu empenho e interesse pela realização do mesmo e por todos os conhecimentos práticos transmitidos.

A todos os membros do LIP pela ajuda, paciência, amizade e disponibilidade ao longo da concretização deste projeto e pela forma como me acolheram, em especial ao Jean-Michel Fernandes pelo acompanhamento na realização do trabalho – crucial para a execução do mesmo.

Também agradeço a toda a minha família e amigos por todo o apoio, carinho e encorajamento demonstrado ao longo desta etapa, em especial ao Pedro – a quem dedico este trabalho.

## **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.

## **Estabilização das Leveduras do Mosto de Uvas Através da Tecnologia de Aquecimento Óhmico**

O trabalho teve como principal objetivo a averiguação do papel da componente elétrica da tecnologia de Aquecimento Óhmico aquando a sua aplicação na inativação microbiológica de mosto de vinho. Teve ainda o propósito da otimização das condições de inativação da estirpe de levedura *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801 – um contaminante problemático na indústria vínica – através da aplicação da tecnologia do Aquecimento Óhmico. Foi ainda, adicionalmente, realizado o levantamento da influência deste tratamento na fermentação de mosto de Vinho Verde.

Verificaram-se efeitos notórios de inativação da estirpe de levedura a baixas temperaturas de tratamento (40 °C) e campos elétricos moderados (400 V/cm). Foi possível constatar o impacto da componente elétrica na mesma inativação, sendo que a baixas temperaturas (40 °C) mas na ausência de campo elétrico ou presença de campos elétricos baixos (75 V/cm ou 90 V/cm) o efeito de inativação foi nulo ou bastante inferior ao visualizado nos ensaios em que se utilizaram campos elétricos moderados de aproximadamente 400 V/cm.

No respeitante à caracterização físico-química dos mostos usados para tratamento no sistema de aquecimento óhmico, verificou-se uma manutenção dos seus parâmetros principais; a sua caracterização microbiológica revelou uma maior presença de *Hanseniaspora uvarum* e *Schizosaccharomyces pombe*, uma espécie desconhecida de coloração verde intenso e espécies de fungos filamentosos. De salientar que os efeitos de inativação por tratamento óhmico observaram-se principalmente nas espécies mais dominantes do mosto.

As condições mais promissoras de tratamento óhmico foram aplicadas no tratamento de mosto de Vinho Verde (casta Fernão Pires), tendo sido comparada a fermentação de mosto tratado em sistema óhmico e a fermentação de mosto sem qualquer tipo de tratamento. Verificou-se uma conformidade das características físico-químicas dos mostos, quer durante a fermentação, quer no vinho final.

Concluiu-se que a Tecnologia do Aquecimento Óhmico é uma alternativa promissora para o controlo microbiológico do processo de produção de Vinhos Verdes, sem que as suas propriedades sejam afetadas por este tratamento.

**Palavras-chave:** Aquecimento Óhmico, Eletro-Tecnologias, Inativação, Mosto, Vinho Verde

## **Stabilization of Yeasts Present in Wine Must Using Ohmic Heating Technologies**

The main objective of this work was to investigate the role of the electricity when using ohmic heating technologies in the microbiological inactivation of wine must. There was also the goal of optimizing the conditions of inactivation of the yeast strain *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801 – a problematic contaminant in the wine industry – when ohmic heating technology was used. In addition, a study was made to analyse the influence of this treatment on the fermentation of must of Vinho Verde.

It was found that there were noticeable inactivation effects on the yeast strain at low treatment temperatures – 40 °C – and moderate electric fields – 400 V/cm. The role of electricity on yeast inactivation was also verified throughout the tests performed at low temperatures – 40 °C – and absence of electric field or presence of low electric fields – 75 V/cm or 90 V/cm – once the inactivation effects were null or significantly lower than the ones observed when using moderate electric fields – 400 V/cm.

Regarding the physicochemical characterization of musts, their main parameters were maintained; while its microbiological characterization revealed a greater presence of *Hanseniaspora uvarum* and *Schizosaccharomyces pombe*, an unknown species of intense green coloration and also species of filamentous fungi. It is also important to point out that inactivation effects promoted by ohmic treatment had higher incidence on the dominant species of the must.

The most promising conditions of ohmic heating treatment were applied in the treatment of Vinho Verde must (Fernão-Pires variety), and the fermentation of ohmic treated must and the fermentation of not-treated must were compared. The physicochemical characteristics of the musts were found to be compatible either during fermentation or in the final wine.

It can be concluded that Ohmic Heating Technology proves to be a promising alternative for the microbiological control of the Vinho Verde production process, without its main properties being affected by this treatment.

**Keywords:** Electro Technologies, Inactivation, Must, Ohmic Heating, Vinho Verde

## Índice

Agradecimentos.....	iii
Estabilização das Leveduras do Mosto de Uvas Através da Tecnologia de Aquecimento Óhmico .	iv
Stabilization of Yeasts Present in Wine Must Using Ohmic Heating Technologies .....	vi
Índice de Figuras .....	x
Índice de Tabelas .....	xv
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos .....	xvi
1.1. Organização da dissertação .....	1
1.2. Estado da Arte.....	1
1.3. Objetivos .....	2
2. Fundamentação Teórica .....	3
2.1. História da Vinha e do Vinho.....	3
2.2. Organização Internacional da Vinha e do Vinho – OIV.....	4
2.2.1. Região Demarcada dos Vinhos Verdes .....	7
2.3. Processo Produtivo do Vinho.....	9
2.3.1 Fatores Que Influenciam a Fermentação.....	11
2.3.2. Microbiologia da Vitivinificação.....	13
2.3.2.1. <i>Dekkera bruxellensis</i> .....	14
2.4. Higiene e Segurança Alimentar na Produção de Vinho Branco.....	15
2.4.1. Desvantagens da Sulfitação .....	16
2.5. Processos Alternativos de Inativação Microbiológica de Vinhos .....	18

2.5.1. As Eletro-Tecnologias Nos Processos de inativação .....	20
2.6. Aquecimento Óhmico (OH) .....	23
3. Metodologias .....	26
3.1. Microbiologia .....	26
3.1.1. Preparação de Meios de Cultura .....	26
3.1.2. Preparação de <i>Stocks</i> de Levedura .....	27
3.1.3. Caracterização Microbiológica das Amostras .....	27
3.1.4. Utilização da Levedura-Alvo .....	28
3.2. Ensaio de Inativação Utilizando o Aquecimento Óhmico .....	28
3.2.1. Avaliação em Mosto de Vinho Verde .....	32
3.3. Caracterização Físico-Química do Mosto de Vinho .....	32
3.4. Fermentação do Mosto de Vinho Verde .....	33
4. Resultados e Discussão .....	35
4.1. Avaliação Preliminar Em Levedura Isolada – Protocolo I .....	35
4.2. Avaliação Preliminar em Levedura Isolada – Protocolo II .....	38
4.3. Avaliação Preliminar Em Levedura Isolada – Protocolo III .....	44
4.4. Avaliação Preliminar em Levedura Isolada – Protocolo IV .....	47
4.5. Caracterização Físico-Química do Mosto de Vinho .....	55
4.6. Caracterização Microbiológica do Mosto de Vinho e Estudo do Tempo de Prateleira .....	58
4.7. Microvinificação do Mosto Não-Tratado e do Mosto Tratado por Aquecimento Óhmico .....	63
5.1 Conclusões .....	68

5.2. Principais Recomendações e Trabalho Futuro .....	69
Bibliografia .....	70
Anexos .....	73

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Selo de garantia da Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV,2019). .....	8
<b>Figura 2</b> Esquema exemplificativo de um sistema de aquecimento óhmico, retirado de Melton, L. <i>et al.</i> , 2019. ....	24
<b>Figura 3</b> Variação da concentração celular para amostras do inóculo de PYCC 4801 retiradas dos 0 min aos 60 min. ....	35
<b>Figura 4</b> Variação da condutividade elétrica (A) e temperatura (B) para amostras do inóculo de PYCC 4801 retiradas dos 0 min aos 60 min. ....	36
<b>Figura 5</b> Variação da concentração célula (A) e condutividade elétrica (B) para amostras do inóculo de PYCC 4801 retiradas dos 0 min aos 60 min de tratamento. ....	37
<b>Figura 6</b> Variação da temperatura para amostras do inóculo de PYCC 4801 retiradas dos 0 min aos 60 min de tratamento. ....	38
<b>Figura 7</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) das amostras submetidas a ensaios com tempo de tratamento de 20 min, a um campo elétrico de 600 V/cm e temperatura de tratamento de 40 °C (A), 75 °C (B) e 90 °C (C). ....	39
<b>Figura 8</b> Temperatura média das amostras submetidas a tratamento óhmico (os números que se seguem à identificação das letras referem-se aos triplicados). ....	40
<b>Figura 9</b> Concentração celular em média no final de cada ensaio de tratamento óhmico. Os caracteres a, b, c e d representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos. ....	41
<b>Figura 10</b> Imagem captada após um período de cinco dias de crescimento em placa das amostras de controlo e das amostras submetidas a tratamento óhmico. ....	41
<b>Figura 11</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) de duas das amostras submetidas a ensaios com tempo de tratamento de 20 min, a um campo elétrico de 600 V/cm e temperatura de tratamento de 40 °C. ....	42
<b>Figura 12</b> Temperatura média das amostras submetidas a tratamento óhmico (os números que se seguem à identificação das letras referem-se aos triplicados). ....	43

<b>Figura 13</b> Concentração celular em média no final de cada ensaio de tratamento óhmico. Os caracteres a, b e c representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos. ....	43
<b>Figura 14</b> Imagem captada após um período de cinco dias de crescimento em placa. ....	44
<b>Figura 15</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para o ensaio a 600 V/cm (A) e 400 V/cm (B), ambos a 40 °C durante um intervalo de 20 min. ....	45
<b>Figura 16</b> Temperaturas médias de tratamento aquando testado o aquecimento óhmico (os números que se seguem à identificação das letras referem-se aos triplicados). ....	46
<b>Figura 17</b> Concentração celular dos inóculos de controlo e os inóculos submetidos a aquecimento óhmico. ....	46
<b>Figura 18</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para dois dos ensaios a 600 V/cm e uma temperatura máxima de 40 °C, por um tempo de tratamento de 20 min, utilizando o inóculo lavado (A) e inóculo não-lavado (B). ....	48
<b>Figura 19</b> Temperaturas médias de tratamento aquando testado o aquecimento óhmico, incluindo os inóculos tratados sem lavagem prévia do meio (NL). ....	49
<b>Figura 20</b> Concentração celular dos inóculos de controlo lavado e não-lavado (NL), para os inóculos que sofreram apenas tratamento por aumento da temperatura e para os inóculos submetidos a aquecimento óhmico lavados e não-lavados. Os caracteres a, b, A e B representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos. ....	49
<b>Figura 21</b> Imagem captada após um período de cinco dias de crescimento em placa. ....	50
<b>Figura 22</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para alguns dos ensaios de tratamento do inóculo de levedura não-lavado a 400 V/cm, temperatura máxima de 40 °C (A) e 75 °C (B), durante um intervalo de tempo de 20 min. ....	51
<b>Figura 23</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para alguns dos ensaios de tratamento de inóculo de levedura não-lavado a 45 V/cm, temperatura máxima de 40 °C (A) e 75 °C (B), durante um intervalo de tempo de 20 min. ....	52
<b>Figura 24</b> Temperaturas médias de tratamento aquando testado o aquecimento óhmico; os números que se seguem à identificação das letras referem-se a cada uma das réplicas. ....	53

<b>Figura 25</b> Concentração celular dos inóculos de controlo, para os inóculos que sofreram apenas tratamento por aumento da temperatura e para os inóculos submetidos a aquecimento óhmico. Os caracteres a e b representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos. ....	53
<b>Figura 26</b> Imagem captada após um período de sete dias de crescimento em placa. ....	54
<b>Figura 27</b> Temperaturas médias de tratamento aquando testado o aquecimento óhmico. ....	54
<b>Figura 28</b> Variação da concentração celular ao longo do tempo para todas as amostras testadas em tratamento óhmico e pelo método convencional, e ainda o controlo. ....	55
<b>Figura 29</b> Análise visual da variabilidade das amostras de mosto corresponde ao mosto 1, 2 e 3 tratados e não-tratados. ....	56
<b>Figura 30</b> Aspeto visual do mosto 2 tratado (à direita) e não-tratado (à esquerda) logo após o tratamento óhmico. ....	57
<b>Figura 31</b> Espécies presentes no mosto 1 tratado e não-tratado no momento logo após o tratamento. ....	59
<b>Figura 32</b> Espécies presentes no mosto 1 tratado e não-tratado passados 11 dias. ....	60
<b>Figura 33</b> Imagens capturadas, respetivamente, logo após o tratamento e passado um período de 4 e 15 dias de crescimento em placa. ....	61
<b>Figura 34</b> Imagens capturadas do mosto 3 no momento zero e 11 dias depois. ....	62
<b>Figura 35</b> Imagem capturada do mosto 4 sem diluição seguida de uma diluição de 1:10. ....	63
<b>Figura 36</b> Variação do peso dos mostos (A) e da densidade (B) ao longo do tempo de fermentação em mosto tratado e não-tratado no decorrer de duas microvinificações distintas. ....	65
<b>Figura 37</b> Variação do pH (B) dos mostos ao longo do tempo de fermentação em mosto tratado e não-tratado no decorrer de duas microvinificações distintas. ....	66
<b>Figura 38</b> Variação da temperatura ao longo do tempo de fermentação em mosto tratado e não-tratado no decorrer de duas microvinificações distintas. ....	66
<b>Figura 39</b> Análise visual dos mostos submetidos a tratamento óhmico e não submetidos a tratamento óhmico. ....	67

<b>Figura 40</b> Exemplo da variação da condutividade elétrica (A) e temperatura (B), respetivamente, em stock de leveduras de baixa condutividade com aplicação de campos elétricos de 400 V/cm – representado a laranja – ou 600 V/cm – representado a cinza – por 20 min de tratamento. ...	74
<b>Figura 41</b> Temperatura média de tratamento para cada amostra submetida a tratamento óhmico. ....	75
<b>Figura 42</b> Concentrações celulares obtidas do controlo e de cada amostra tratada no reator de tratamento óhmico. ....	75
<b>Figura 43</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) da amostra OBZ2. ....	76
<b>Figura 44</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) da amostra OBZ3. ....	76
<b>Figura 45</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para o ensaio a 600 V/cm (A) e 400 V/cm (B), ambos a uma temperatura de ensaio de 40 °C durante um intervalo de 20 min. ....	77
<b>Figura 46</b> Temperaturas médias de tratamento aquando testado o aquecimento óhmico. ....	78
<b>Figura 47</b> Concentração celular dos inóculos de controlo e os inóculos submetidos a aquecimento óhmico. ....	78
<b>Figura 48</b> Imagem captada após um período de oito dias de crescimento em placa. ....	79
<b>Figura 49</b> Percentagem de células mortas das amostras de mosto lavado e não-lavado submetidas a tratamento convencional a 40 °C e a tratamento óhmico à mesma temperatura. ....	79
<b>Figura 50</b> Imagem capturada de uma célula morta de OAZ,NL (A) e uma célula viva de Controlo,NL (B). ....	80
<b>Figura 51</b> Percentagem de células mortas das amostras de mosto lavado e não-lavado submetidas a tratamento convencional a 40 °C e a tratamento óhmico à mesma temperatura. ....	80
<b>Figura 52</b> Imagem capturada de uma célula viva de controlo (A) e células mortas de CA (B) e OAV (C), em câmara de Neubauer. ....	81
<b>Figura 53</b> Imagem capturada em câmara de Neubauer de células mortas de OAX (A) e OBX (B) sem ter sido usada qualquer diluição das amostras. ....	81

<b>Figura 54</b> Percentagem de células mortas das amostras de mosto lavado e não-lavado submetidas a tratamento convencional a 40 °C e a tratamento óhmico à mesma temperatura.	82
<b>Figura 55</b> Imagem capturada em câmara de Neubauer de uma célula viva do Controlo (A) e células mortas de CA (B), CB (C), OAW (D) e OBW (E).....	82
<b>Figura 56</b> Imagem capturada em câmara de Neubauer de células mortas de OAX (A) e OBX (B). .....	82
<b>Figura 57</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para um tratamento de inóculo de levedura não-lavado com campo elétrico de 400 V/cm e uma temperatura máxima de 40 °C durante um intervalo de tempo de 20 min. ....	83
<b>Figura 58</b> Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para um tratamento de inóculo de levedura não-lavado com campo elétrico de 400 V/cm e uma temperatura máxima de 75 °C durante um intervalo de tempo de 20 min. ....	83
<b>Figura 59</b> Variação da temperatura para um tratamento de inóculo de levedura não-lavado com campo elétrico de 90 V/cm, temperatura máxima de 40 °C durante um intervalo de tempo de 20 min. ....	84
<b>Figura 60</b> Variação da temperatura para um tratamento de inóculo de levedura não-lavado com campo elétrico de 90 V/cm, temperatura máxima de 75 °C durante um intervalo de tempo de 20 min. ....	84
<b>Figura 61</b> Variação da temperatura e da condutividade elétrica para o tratamento do mosto 1 (A) e mosto 2 (B) a um campo elétrico de 50 V/cm e temperatura máxima de 40 °C.....	85
<b>Figura 62</b> Variação da temperatura e da condutividade elétrica para o mosto 3 (A) e mosto 4 (B) com um campo elétrico de 75 V/cm e temperatura máxima de 40 °C.....	86
<b>Figura 63</b> Variação da concentração de açúcares redutores ao longo do tempo de fermentação em mosto tratado e não-tratado no decorrer de duas microvinificações distintas.....	88

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> Limites analíticos e limites de emprego de certas substâncias em vinhos, bebidas espirituosas e vinagre de vinho estabelecidos pela IVV (2019) .....	5
<b>Tabela 2.</b> Teores máximos de certos contaminantes estabelecidos pela IVV (2019) .....	6
<b>Tabela 3.</b> Métodos de controlo microbiano e respetivos mecanismos de ação, baseado na publicação de Bartowsky, E. J. (2009) .....	18
<b>Tabela 4.</b> Metodologias aplicadas a inóculos de levedura de <i>D. bruxellensis</i> PYCC 4801, expondo as suas condições de operação específicas e objetivos gerais.....	29
<b>Tabela 5.</b> Terminologia referente às condições de ensaio a que foram submetidas as amostras testadas .....	31
<b>Tabela 6.</b> Concentração de açúcares redutores dos vários mostos (quantificada pelo método DNS) sujeitos, ou não, a tratamento óhmico.....	86

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

DO	Denominação de Origem
IG	Identificação Geográfica
OH	Aquecimento Óhmico
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho
PEF	Campos Elétricos Pulsados
POH	Aquecimento Óhmico Pulsado
PYCC	Portuguese Yeast Culture Collection
RCV	Registo Central Vitícola
SO <sub>2</sub>	Dióxido de enxofre
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	lão sulfito
SO <sub>x</sub>	Óxidos de enxofre
WL	Wallerstein Laboratory Nutrient
YPD	Yeast Peptone Dextrose
AT	Acidez Total
AR	Concentração Em Açúcares Redutores
CM	Concentração Microbiológica das Amostras
SST	Sólidos Solúveis Totais
t	Tempo
T	Temperatura
TP	Teor Proteico
UFC	Unidades Formadoras de Colónia
V	Tensão da corrente
V <sub>NaOH</sub>	Volume de titulante

## **1.1. Organização da dissertação**

O presente documento foi dividido em cinco capítulos principais. O primeiro capítulo destina-se ao esclarecimento do desafio proposto da sua relevância no contexto atual; o segundo capítulo refere-se à secção onde é feito um levantamento dos temas discutidos no decorrer da dissertação, ou seja, o processo de produção de vinho, os seus principais desafios e, por fim, as metodologias atuais e emergentes referentes a essa área de bioprocessos; no terceiro capítulo descrevem-se os materiais e métodos experimentais empregues no âmbito da dissertação; no quarto capítulo é realizada a apresentação e discussão dos resultados obtidos; sendo que no quinto capítulo apresentaram-se as principais conclusões e recomendações para trabalhos futuros.

## **1.2. Estado da Arte**

O Vinho Verde é um produto nacional produzido exclusivamente na Região Demarcada dos Vinhos Verdes. É um vinho notoriamente fresco e frutado cujo interesse e procura tem sido cada vez mais manifestados. Segundo os dados da Comissão Reguladora, o Vinho Verde é um produto que tem vindo a ser cada vez mais procurado por mercados estrangeiros, sendo que a sua procura tem vindo a aumentar exponencialmente nos últimos 20 anos, gerando no ano de 2018 mais de 63 M€ e mais de 26·10<sup>6</sup> L de vinho vendidos (CVRVV, 2019). É então de interesse a otimização da sua produção, optando por processos com menor impacto ambiental e com o mínimo de operações adicionais de maneira que haja a mínima alteração das suas propriedades de eleição.

Já o processo de produção do vinho acarreta uma grande variabilidade de microrganismos, que poderão influenciar a fermentação alcoólica e manifestar ser um perigo para a saúde do consumidor. O método universalmente utilizado para conservação do mosto baseia-se na adição de dióxido de enxofre. Este composto, adicionado ao mosto e ao vinho mais comumente na forma líquida – denominada por solução sulfurosa – é um produto antimicrobiano e antioxidante, contudo com propriedades tóxicas e alergénicas e associado a custos adicionais para a sua remoção do produto final (Puxeu, M. *et al.*, 2018).

Surge então uma necessidade e oportunidade para a conceção de uma nova e melhor alternativa a esta etapa industrial. Uma alternativa promissora consiste na aplicação de corrente elétrica para o controlo microbiológico do mosto de vinho.

### 1.3. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho consiste no esclarecimento do papel do efeito não térmico da tecnologia de aquecimento ohmico na inativação de uma estirpe de levedura considerada de maior risco - *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801 – averiguando também o papel da intensidade do campo elétrico aplicado. Como objetivos secundários, pretende-se igualmente avaliar os seguintes pontos:

- A avaliação da sinergia dos efeitos térmicos e não térmicos na inativação da *D. bruxellensis*, combinando aplicação de campo elétrico com o aumento da temperatura média de tratamento (incluindo comparação com o tratamento térmico convencional);
- A avaliação dos efeitos da aplicação de diferentes intensidades de campo elétrico entre os 50 V/cm e os 600 V/cm na inativação de *D. bruxellensis*;
- A aplicação das condições de tratamento elétrico mais promissoras em mosto de vinho verde fresco e avaliação dos resultados nas componentes microbiológica e física e química
- A avaliação preliminar do impacto destes tratamentos na fermentação do mosto tratado e averiguação das suas principais características físico-químicas.

## 2. Fundamentação Teórica

### 2.1. História da Vinha e do Vinho

Pensa-se que o Homem pré-histórico terá sido o primeiro a criar, por acidente, uma bebida de sumo de uva fermentado – tendo sido encontrados registos arqueológicos da sua produção até 5000 a.C. na região que é conhecida como o Crescente Fértil (Jackson R.S, 2008).

Com a transição do nomadismo para o sedentarismo, a domesticação da videira terá vindo acoplada à conceção da agricultura de vários produtos alimentares. E terá sido desta maneira que, com o tempo, espécies capazes de produzir cachos mais densos, com bagos de uva maiores e mais concentrados em açúcares e aromas foram sendo preferidos e, portanto, mais procurados pelas populações. Tal acontecimento despoletou, então, uma seleção natural por videiras com esse tipo de características, desenvolvendo-se simultaneamente agrupamentos de características da uva em variedades consoante as suas particularidades, que ao longo do tempo vieram-se a conhecer e denominar pelas variedades de uva que se conhecem nos dias de hoje (Harding, J. *et al.*, 2012).

Atualmente existem várias espécies de videira – plantas pertencentes à família *Vitaceae*, género *Vitis* – sendo que a maioria destas é nativa à América do Norte e Ásia Oriental – como o exemplo da espécie *Vitis labrusca*, videira natural da América do Norte cujas uvas produzem um vinho com aromas bastante distintos, como sendo o aroma a pelo animal e a fruta cristalizada, e *Vitis amurensis*, planta nativa da Ásia Oriental. Contudo, é a espécie nativa da Eurásia que é a mais utilizada na indústria vínica, a *Vitis vinífera*. Esta espécie, considerada superior em termos de qualidade e aromas que confere ao vinho, ainda pode ser dividida em duas subespécies: *Vitis vinífera* L. subsp. *vinífera* – planta hermafrodita domesticada na zona da Eurásia – e *Vitis vinífera* L. subsp. *silvestris* – planta dióica selvagem encontrada no Ocidente Europeu, Norte de África e até em países da Ásia Central (Harding, J. *et al.*, 2012).

Desde então, a uva provou ser o fruto de maior produção e comercialização agrícola a nível mundial, uma vez que pode ser usada tanto para consumo – uvas de mesa ou uvas passas – como para produção de bebidas alcoólicas. Em 2018, dados da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) revelam que a produção de vinho atingira um dos maiores picos de produção desde o ano 2000 – sendo este valor apenas ultrapassado nos anos 2004 e 2013. Foram somados cerca de 282 milhões de hectolitros de vinho produzidos a nível mundial, em que os países mais produtores foram a Espanha, França e Itália.

## **2.2. Organização Internacional da Vinha e do Vinho – OIV**

Com o passar do tempo, gerou-se a necessidade de haver uma entidade reguladora com o objetivo de socorrer e padronizar a produção e comercialização de uvas e de vinho. E foi assim que, em 2001 foi criada a Organização Internacional da Vinha e do Vinho por 35 estados soberanos – sendo que, em 2018, esse número atingiu os 47 estados membros, e ainda conta com a participação de entidades como a União Europeia (EU) e a International Wine Law Association (AIDV). Esta é uma organização com o principal objetivo de *standardizar* as práticas enológicas a nível mundial, e é a entidade de referência tanto no domínio das vinhas, do vinho e das bebidas à base de vinho como de todos os produtos derivados da vinha.

Segundo esta, no Regulamento EU nº 1308/2013 do Parlamento Europeu e do seu Conselho, vinho é qualquer produto produzido exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mosto de uvas. Já uvas são o fruto da videira utilizados para vinificação, maduros ou mesmo ligeiramente passados, suscetíveis de serem esmagados ou espremidos com os meios normais de adega e de originarem espontaneamente uma fermentação alcoólica. Mosto de uvas é o produto líquido obtido naturalmente ou por processos físicos a partir de uvas frescas, cujo título alcoométrico volúmico adquirido não poderá ultrapassar o valor de 1 %.

Para além da OIV, ainda foi criada uma entidade nacional em 1986, denominada por Instituição da Vinha e do Vinho (IVV), com o objetivo de promover os produtos vitivinícolas, garantir o funcionamento da Comissão Nacional da Organização Internacional da Vinha e do Vinho e auditar o sistema de certificação de qualidade, entre outras funções. Esta disponibilizou limites de segurança da presença de uma variedade de substâncias que poderão ocorrer nesses produtos – alguns dados mais relevantes encontram-se expostos na Tabela 1 – e ainda forneceu dados para os limites de segurança em caso da presença de certos contaminantes vínicos – estando estes presentes na Tabela 2.

**Tabela 1** Limites analíticos e limites de emprego de certas substâncias em vinhos, bebidas espirituosas e vinagre de vinho estabelecidos pela IVV (2019)

<b>Parâmetro</b>	<b>Limite</b>	<b>Base Jurídica</b>
<b>Acidez Total</b>		
Vinhos (expressa em ácido tartárico)	$\geq 3,5$ g/l $\geq 46,6$ meq/L	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III- 1 d)
<b>Acúcares</b> (teor em açúcares, expresso em glucose + frutose)		
vinhos espumantes		Reg. (CE) n° 607/2009, Anexo XIV - Parte A
"bruto natural"	< 3 g/L	
"extra bruto"	0 - 6 g/L	
"bruto"	< 12 g/L	Reg. (CE) n° 607/2009, Anexo XIV - Parte A
"extra seco"	12 - 17 g/L	
"seco"	17 - 32 g/L	
"meio seco"	32 - 50 g/L	
"doce"	> 50 g/L	
Produtos diferentes dos vinhos espumantes		Reg. (CE) n° 607/2009, Anexo XIV – Parte B
"seco"	não superior a: - 4 g/L ou - 9 g/L , se a acidez total, expressa em g/L de ácido tartárico, não for inferior em mais de 2 g/L ao teor de açúcar residual	
"meio seco", "adamado"	superior ao máximo acima indicado, mas não superior a: - 12 g/L ou - 18 g/L , se a acidez total, expressa em g/L de ácido tartárico, não for inferior em mais de 10 g/L ao teor de açúcar residual	
"meio doce"	superior ao máximo acima indicado, mas não superior a: - 45 g/L	

**Tabela 1.** Limites analíticos e limites de emprego de certas substâncias em vinhos, bebidas espirituosas e vinagre de vinho estabelecidos pela IVV (2019) (continuação)

<b>Parâmetro</b>	<b>Limite</b>	<b>Base Jurídica</b>
<b>Acúcares</b> (teor em açúcares, expresso em glucose + frutose)		
"doce"	≥ 45 g/l	
Vinhos tintos e palhetes	≥ 1,8 g/l	Reg. (CE) n° 607/2009, Anexo XIV – Parte B
<b>Sulfatos</b> (expresso em sulfato de potássio)		
Vinhos	≤ 2 g/l	Portaria n° 334/94, de 31 de Maio
<b>Título Alcoométrico Volúmico Total</b> (TAV Total)		
Vinho	≤ 15% vol.	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III – 1 c)
Vinho Licoroso	≥ 17,5% vol.	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III – 3 b)
Vinho espumante	≥ 8,5% vol.	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III – 4 d)
Vinho espumante de qualidade	≥ 9% vol.	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III – 5 d)
Vinho espumante de qualidade tipo aromático	≥ 10% vol.	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III – 6 d)
Vinho frisante	≥ 9% vol.	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III – 8 a)
Vinho frisante gaseificado	≥ 9% vol.	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III – 9 b)
Vinho proveniente de uvas passa	≥ 16% vol.	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III – 15 b)
Vinho de uvas sobreamadurecidas	≥ 15% vol.	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III – 16 c)

**Tabela 2.** Teores máximos de certos contaminantes estabelecidos pela IVV (2019)

<b>Contaminante</b>	<b>Limite</b>	<b>Base Jurídica</b>
<b>Chumbo</b>	≤ 0,15 mg/kg	Reg. (CE) n° 1881/2006, Secção 3.1 do Anexo
<b>Ocratoxina A</b>	≤ 2,0 µg/kg	Reg. (CE) n° 1881/2006, Secção 2.2. do Anexo
<b>Patulina</b>	≤ 50 µg/kg	Reg. (CE) n° 1881/2006, Secção 2.3. do Anexo

### **2.2.1. Região Demarcada dos Vinhos Verdes**

O vinho produzido em Portugal é notoriamente um produto bastante solicitado, tanto pelo mercado nacional como por mercados estrangeiros, tendo mesmo sido criado em 1703 um tratado entre Portugal e Inglaterra com o objetivo de regulamentar a entrada de vinho português em regime especial nesse país – conhecido como o tratado de Methween. Mas foi em 1908 que o rei D. Carlos demarcou oficialmente a região vitivinícola dos Vinhos Verdes, cuja área geográfica engloba as sub-regiões de Monção e Melgaço, Lima, Cávado, Ave, Basto, Sousa, Amarante, Paiva e Baião – cada uma com o seu clima específico e características geológicas e de solo, que fazem com que estas regiões estejam também mais aptas a produzir uvas de um certo número de castas.

E foi em 1926 que foi criada a Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV) e novamente acentuada a delimitação da região, com o Decreto n.º 12.866. Esta instituição nacional determinou como sua principal missão a promoção, controlo e certificação dos produtos víquicos com Denominação de Origem Vinhos Verde e Identificação Geográfica Minho, bem como a defesa do património regional e nacional dos Vinhos Verdes e o apoio e dinamização da melhoria da qualidade da vinha (CVRVV, 2019).

Sabe-se então que a Denominação de Origem (DO) de Vinhos Verdes engloba tanto vinhos tranquilos, como espumantes, aguardentes víquicas e bagaceiras e até mesmo vinagres; estando estes sujeitos a uma série de requisitos e legislações associadas à deliberação dessa designação, que vão desde as castas que poderão ser selecionadas às características organoléticas do vinho final. Esta denominação surge como uma garantia do nível de qualidade dos vinhos que lhe estão associados – existindo ainda a Indicação Geográfica (IG), cuja designação é também controlada pela Entidade Certificadora e a qual segue as suas próprias legislações e requisitos específicos.

Para um vinho obter a designação de Vinho Verde é, então, necessário atravessar uma série de requisitos, iniciando-se pelo cadastro das parcelas de vinha no Registo Central Vitícola (RCV), a inscrição na entidade certificadores de todos os produtores e comerciantes a operarem com o produto, também a identificação das instalações e confirmação da sua área geográfica pertencer à região demarcada, devendo ainda ser entregue a Declaração de Colheita e Produção (DCP).

Sabe-se ainda que o Regulamento CE n.º 479/2008 dita que um levantamento, por parte da entidade controladora, deve ser feito anualmente aos produtos nos laboratórios da CVRVV (no caso dos Vinhos Verdes) das suas características organoléticas e analíticas e verificação do

cumprimento das exigências estabelecidas – desde a concentração de açúcares totais (expressa em frutose e glucose), a acidez total, a acidez volátil, concentração de dióxido de enxofre total ao teor alcoólico total e adquirido, passando ainda por uma análise aos aromas, sabor e aspeto do produto. Para produtos vînicos que tenham sofrido alguma retificação ou ajuste dos seus parâmetros físico-químicos, o mesmo Regulamento ainda impõe que estes sejam mencionados – é o exemplo da acidificação ou desacidificação, a adição de dióxido de enxofre, o aumento do título alcoométrico e o uso de novas práticas enológicas.

O vinho deve ser privado de defeitos organoléticos, com aromas e sabor característicos da sua região demarcada, ainda provendo de características específicas de uma sub-região aquando a identificação da mesma – tendo estes parâmetros de qualificar numa notação igual ou superior a seis (numa escala de 1 a 10) para ambos os casos (CVRV, 2019).

Ainda, os produtores deverão garantir que o seu rendimento máximo, por hectare de vinha, não ultrapassa os 10666 kg, dos quais o rendimento em mosto de uva após a remoção dos bagaços não ultrapassa os 75 L por 100 kg de uvas – exceto para a casta Alvarinho, cujo limite é 65 L de mosto por cada 100 kg de uvas (CVRV, 2015).

Aquando a rotulagem, deverá constar a designação do produto bem como a sua marca, uma indicação da sua proveniência, uma referência ao lote e ao engarrafador, o seu título alcoométrico volúmico adquirido, o volume nominal, indicação da presença de alergénios e ainda, no caso de se tratar de um vinho opalino, deverá prover de uma menção da possibilidade da formação de um depósito. Facultativamente poderá ter, entre outras indicações, uma referência à cor, ao seu ano de colheita e às castas presentes.

Portanto, só após um cumprimento e verificação de todos os requisitos estabelecidos é que o produto poderá ser candidato a utilizar o selo de garantia cedido pela Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes, tal como é possível ver na Figura 1 (CVRV, 2019).



**Figura 1** Selo de garantia da Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRV,2019).

### **2.3. Processo Produtivo do Vinho**

A vinificação, ou seja, o processo produtivo do fabrico de vinho inicia-se com a colheita da uva e o que é conhecido por práticas pré-fermentativas, ou seja, o desengace e o esmagamento. Estes passos, respetivamente, referem-se à separação das uvas dos engaços, folhas e material lenhoso a elas associado, e ao esmagamento das uvas com a rotura da película e libertação da polpa e sumo.

No que diz respeito ao desengace, este passo poderá ser de especial interesse no processo industrial, uma vez que retira os compostos fenólicos – catequinas, flavonoides e ácido caftárico – do vinho final. Porém, estes compostos poderão ser de especial interesse no caso da produção de vinho tinto cuja variedade da uva utilizada seja caracteristicamente pobre em compostos fenólicos. Os compostos fenólicos presentes na película conferem uma sensação de adstringência e amargura menores em comparação aos fenóis presentes nos engaços e nas grainhas. Apesar de não ser tão usado atualmente, há quem evite este passo na produção de vinho tinto, uma vez que aumenta a concentração de taninos, que proporcionam ao vinho uma maior densidade de cor e a sensação de um vinho mais encorpado (Jackson R.S. ,2008).

Já o esmagamento deve ser feito o mais próximo possível do desengace, e na verdade, na colheita da uva, de modo a evitar a contaminação e efeitos de escurecimento nas uvas que acidentalmente são rebentadas durante os passos que o precedem.

Entre os passos de desengace e esmagamento, poderá ainda haver uma seleção das uvas, de maneira a remover materiais indesejados deixados após o desengace – entre os quais insetos, uvas que não tenham atingido o seu pico de maturação e uvas que tenham sofrido reações de escurecimento – para não comprometer a qualidade do produto final.

Seguidamente, tem-se a maceração da uva, em que sucede a rotura da película e caracteriza-se pela libertação da polpa e grainhas e o contacto destes três constituintes. Este contacto irá facilitar a libertação de vários compostos como ácidos gordos, álcoois superiores, enzimas hidrolíticas e compostos varietais como conjugados de S-cisteína, que irão ainda facilitar a fermentação e melhorar a viabilidade da levedura fermentativa. Mas também poderá levar a reações e processos indesejáveis, como a transferência de proteínas que são instáveis ao calor – tal ocorrência pode ser remediada pelo uso de estabilizantes químicos, ou prevenida através de um tempo de maceração mais curto (Jackson R.S., 2008).

Uma maceração a baixas temperaturas por intervalos de tempo reduzidos produz vinhos mais frescos e frutados, enquanto que altas temperaturas e intervalos de tempo maiores geram vinhos com cor e sabor mais intensos. Sendo assim, a elaboração do protocolo para o passo da maceração irá depender, entre outras variáveis, do produto que se pretende obter, da qualidade da matéria prima e do equipamento disponível.

O passo seguinte ao da maceração consiste na prensagem. Para tal, são utilizadas prensas, que podem ter várias opções de design e assim influenciar o produto final – são estas a prensa vertical, prensa horizontal, prensa pneumática e prensa contínua de parafuso de Arquimedes. O mosto resultante desta fase tem características distintas consoante o nível de esmagamento obtido, sendo que, com o aumento deste, algumas das características do mosto serão, por exemplo: a maior turbidez, maior concentração em compostos fenólicos, compostos derivados da película, menor acidez e maior probabilidade de oxidação de certos compostos (Jackson R.S., 2008).

Antes da fermentação, é comum ocorrer a clarificação do mosto de modo a impedir a catálise enzimática de alguns compostos e manter o vinho frutado. Porém, uma clarificação excessiva deve ser evitada uma vez que remove grandes quantidades de ácidos gordos, esteróis, aumenta a produção de ácido acético e diminui a viabilidade da levedura fermentativa, retardando tanto a fermentação alcoólica como a fermentação malolática.

Este passo poderá ser feito de várias maneiras: através da adição de colas – como a caseína ou a bentonite – ou de enzimas pectolíticas; pela sedimentação gravítica natural e posterior decantação; ou ainda assistida com uso de centrífugas, filtração com o uso de terras de diatomáceas, por flotação ou, alternativamente, por hiperoxigenação – sendo que os dois últimos correspondem à adição de um gás (azoto ou oxigénio, respetivamente) que irá arrastar os sólidos suspensos e facilitar a sua remoção (Jackson R.S., 2008).

A fermentação alcoólica é um metabolismo natural da maior parte dos microrganismos na ausência de oxigénio. Para a produção de vinho, os microrganismos mais comumente usados são a *Oenococcus oeni* e *Saccharomyces cerevisiae* devido à sua resistência a altas concentrações de álcool, sendo que a última tem a particularidade de optar pela fermentação ao invés da respiração – mesmo na presença de oxigénio – e é ainda resistente a altos níveis de acidez. Esta levedura é, portanto, capaz de dominar o meio quanto mais avançado for o estágio da fermentação (Jackson R.S., 2008).

O início da fermentação, no entanto, é caracterizado por uma alta concentração de açúcares e nutrientes, e baixa concentração de etanol e microrganismos. À medida que os microrganismos se vão adaptando ao meio e entrando na sua fase exponencial de crescimento, ocorre o consumo dos açúcares do meio de forma proporcional à produção de etanol até ao ponto em que os recursos do meio começam a escassear. Nesse momento, atinge-se a fase estacionária, onde a velocidade de multiplicação celular é igual à velocidade de morte. As altas concentrações de etanol e toxinas resultantes do metabolismo das leveduras são limitantes para a sobrevivência da grande maioria dos microrganismos, apenas os mais resistentes – que é o caso da *Saccharomyces cerevisiae* - capazes de sobreviver nestas condições extremas.

Após a fermentação, o vinho é deixado a maturar (repouso em cuba, casco ou ao ar livre) e/ou envelhecer (repouso em garrafa). É nesta fase que o vinho irá adquirir as suas últimas propriedades como o desenvolvimento de cor e aromas e sabores que evoluem com o tempo, tendo ainda compostos coloidais oportunidade de flocularem e sedimentarem. No final é engarrafado em embalagens TETRA PAK, bag-in-box ou em garrafa de vidro com o respetivo vedante, e, assim, expedido (Jackson R.S., 2008).

### **2.3.1 Fatores Que Influenciam a Fermentação**

A fermentação alcoólica de vinhos trata-se de um processo complexo, com um amplo leque de variáveis que poderão beneficiar ou prejudicar o vinho final; naturalmente, algumas destas são de especial atenção.

De entre todas as variáveis, é de destacar as possíveis fontes de carbono. E embora haja um número de possíveis fontes de carbono – como glicerol e aminoácidos – estes nutrientes encontram-se presentes, de um modo geral, em pequenas quantidades, ou, alternativamente, podem ser utilizados durante a respiração. Desse modo, a glucose e a frutose são as fontes de carbono mais comuns para este tipo de fermentação (Jackson, R.S., 2008).

As uvas, ainda, ao atingirem o seu pico de maturação, obtêm uma concentração em açúcares entre os 20% e os 25%. No entanto, maiores concentrações de açúcares resultarão numa maior probabilidade de a fermentação ser interrompida – uma vez que a presença dos açúcares incita *stress* celular e aumenta a pressão osmótica – e provocar o aumento da produção de ácido acético e ésteres, bem como de afetar a síntese de compostos aromáticos (Ferreira, J., 2004; Jackson R.S., 2008).

Outro parâmetro a ter em conta é a presença e concentração de álcoois. É sabido que álcoois (principalmente álcoois superiores) são tóxicos para qualquer estrutura celular. Propriedades como o bloqueio do transporte de amónio e a possibilidade de este composto provocar a redução da atividade da água (afetando a membrana celular e atividade enzimática), fazem com que a presença de este composto tenha uma grande influência na fermentação, mesmo a baixas concentrações (Ferreira, J. 2004; Jackson R.S., 2008).

No entanto, e tal como já foi mencionado, a *S. cerevisiae* é uma levedura capaz de suportar altas concentrações desta categoria de compostos. Pensa-se que tal facto se deve, entre outros motivos, às modificações a nível da membrana que esta espécie instiga na presença de álcool e que geram a retenção de substâncias como magnésio, cálcio e outros nutrientes.

Compostos nitrogenados, presentes maioritariamente sob a forma de aminoácidos e iões amónio, são compostos considerados essenciais no decorrer da fermentação alcoólica, e possivelmente a principal causa para a paragem da fermentação. No entanto, a sua concentração é altamente variável – uma vez que concentrações superiores deste composto dão origem a divisões celulares indesejadas por parte da levedura fermentativa e, conseqüentemente, a uma paragem antecipada da fermentação; já concentrações baixas destes compostos despoletam a produção de álcoois superiores (Ferreira, J., 2004; Jackson R.S., 2008).

O dióxido de enxofre é um composto produzido pelas leveduras fermentativas, mas também pode ser adicionado de modo a haver um controlo microbiano tanto da matéria-prima como do produto. Porém, este também pode contribuir para a extração de compostos fenólicos, influenciar a fermentação e o metabolismo da levedura fermentativa – que liberta acetaldéido, ácido pirúvico e ácido  $\alpha$ -cetoglutárico – mas, no entanto, poderá afetar a estabilidade da cor do vinho final (Ferreira, J., 2004; Jackson R.S., 2008).

Lípidos, especificamente ácidos gordos insaturados de cadeia longa e esteróis, uma vez que não são sintetizados pela célula em condições de anaerobiose, podem ser gerados com a ajuda de precursores presentes na película. No entanto, é de especial atenção a intensidade da clarificação do mosto, uma vez que esta remove grande parte dos ácidos gordos presentes. Tal facto pode levar à paragem antecipada da fermentação, uma vez que estes compostos contribuem para a manutenção da integridade da membrana celular, bem como a sua permeabilidade, estando então diretamente relacionados à tolerância e sobrevivência da levedura a altas concentrações de álcoois (Ferreira, J., 2004; Jackson R.S., 2008).

A fermentação alcoólica é um mecanismo possível apenas na ausência de oxigénio. Apesar disso, pequenas quantidades deste composto favorecem a formação de esteróis e de ácidos gordos insaturados de cadeia longa (entre outros compostos), que irão beneficiar a fermentação. A incorporação deste composto ocorre maioritariamente durante a maceração, e a sua maior incorporação poderá tanto ser benéfica como prejudicial. Entre outros motivos, uma maior incorporação de oxigénio favorece o crescimento celular e a estabilização da cor dos vinhos tintos, porém, na fermentação dos vinhos brancos, este aumenta a produção de acetaldeído e de outros compostos indesejados (Ferreira, J., 2004; Jackson R.S., 2008).

Com o decorrer da fermentação há a libertação de dióxido de carbono. Acoplado a este composto poderão ser libertados outros compostos – tais como álcoois e monoterpenos. Esse arrastamento por parte do dióxido de carbono é uma função da cinética de síntese e degradação de cada composto, bem como da sua solubilidade relativa e do tamanho e dimensões do reator. Já o aumento da pressão associado à formação de dióxido de carbono pode afetar a estrutura e funcionalidades das proteínas das células, bem como a permeabilidade membranar das mesmas (Jackson, R.S., 2008).

Por fim, a temperatura é também um dos fatores com maior influência no que diz respeito à fermentação, sendo igualmente uma das variáveis mais facilmente controláveis de todo o processo. Temperaturas muito baixas diminuem efeitos tóxicos do etanol, aumentando a longevidade das células e diminuindo a sua multiplicação, prolongando ainda a cinética de fermentação. Já temperaturas muito altas tendem a comprometer as estruturas celulares e membranares, diminuindo a viabilidade das células, provocar a desnaturação das enzimas e causar uma paragem antecipada da fermentação. Deste modo, a temperatura considerada como ideal para a fermentação alcoólica é entre os 15 °C e os 20 °C (Ferreira, J., 2004; Jackson, R.S., 2008).

### **2.3.2. Microbiologia da Vitivinificação**

No processo produtivo do vinho, há uma variedade de espécies microbianas que estão envolvidas nos seus diferentes passos, quer por fazerem parte da constituição microbiana natural da uva aquando o cultivo, quer por desempenharem algum papel durante a fase fermentativa. Ao atingirem o seu pico de maturação, a espécie mais presente na uva trata-se da *Kloeckera apiculata* (forma sexuada de *Hanseniaspora*) e, ocasionalmente, haverá a presença de *Brettanomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Saccharomyces*, entre outras espécies – sendo que a *Hanseniaspora*, *Candida*

e *Pichia* são as espécies mais frequentes em uvas, folhas e engaços. Já na adega, as espécies mais presentes são a *Hansenula anomala*, *Pichia membranaefaciens*, *Brettanomyces* e *Aureobasidium pullulans*. Ainda, a *Saccharomyces cerevisiae* é atualmente considerada a levedura de excelência quando o objetivo é a fermentação alcoólica de uma matriz alimentar. No entanto, a sua presença na vinha é rara (Cardoso, R., 2015; Ferreira, J., 2004; Jackson R.S., 2008).

No que diz respeito à fermentação, uma vez que é inoculada a levedura fermentativa – *S. cerevisiae* – não é considerada relevante a presença de outras espécies microbianas, uma vez que, com o decorrer da fermentação, estas não estejam adaptadas a sobreviver nas condições extremas do meio – altas concentrações de etanol, ausência de oxigênio, elevadas pressões osmóticas – limitando cada vez mais a competição até estar só presente a levedura fermentativa. Sabe-se que, numa fermentação espontânea, inicialmente a *Kloeckera spp.* e *Candida spp.* são as espécies que se encontram presentes em maiores concentrações no início da fermentação, disfrutando das condições iniciais do meio e das pequenas concentrações de etanol – usualmente entre os 4 % e os 10 % (Jackson R.S., 2008).

De seguida, estas espécies são substituídas por espécies cada vez mais resistentes ao etanol – e que, no entanto, eram mais sensíveis a concentrações de açúcares mais elevadas e valores de pH mais baixos, entre outros fatores – sendo, por fim, substituídas pela *S. cerevisiae*, que não encontra competição no final da fermentação uma vez que outras espécies não resistem às condições em que se encontra o meio nesse estágio da fermentação, com a exceção de bactérias ácido-láticas (Cardoso, R., 2015; Jackson R.S., 2008).

Fermentações espontâneas, em comparação às fermentações induzidas, produzem vinhos com uma maior complexidade de aromas, porém com pouco controlo microbiano; enquanto que fermentações induzidas produzem vinhos com menor complexidade mas com um controlo microbiano superior.

### **2.3.2.1. *Dekkera bruxellensis***

Foi no ano de 1904 que a levedura *Brettanomyces* foi pela primeira vez isolada com sucesso, e foi em 1964 que van der Walt descreveu pela primeira vez o género *Dekkera* como sendo a forma produtora de esporos de *Brettanomyces*. Atualmente são reconhecidas cinco espécies pertencentes ao grupo *Dekkera/Brettanomyces*, sendo estas: *D. bruxellensis*, *D. anomala*, *B. naardenensis*, *B. nana* e *B. custersianus* (Dashko, S., 2014).

De entre todas estas espécies, destaca-se a *Dekkera bruxellensis*. Esta levedura partilha um número de características com *Saccharomyces cerevisiae*, nomeadamente a sua habilidade de optar pela fermentação alcoólica em condições de anaerobiose – no entanto, é uma espécie cuja variabilidade entre estirpes torna-a imprevisível de ser usada como levedura fermentativa. É também observável a produção de ácido acético em condições de aerobiose e produção residual de glicerol. Ainda, estudos recentes têm vindo a demonstrar as possíveis aplicações desta espécie na produção de bioetanol (Blomqvist, J., 2015).

Contudo, para o mundo vitivinícola, esta espécie obtém um maior foco uma vez que é considerada um dos maiores contaminantes na produção de vinho. Devido à sua variada atividade enzimática, *D. bruxellensis* é capaz de gerar *off-flavours* – entre os quais o aroma a suor de cavalo, estábulo ou medicinal – quando esta se encontra presente no vinho, e, apesar de a sua taxa de crescimento ser baixa, é capaz de competir (e ainda dominar) *S. cerevisiae* (Blomqvist, J., 2015).

Considerando o processo de vinho na totalidade, a contaminação por *D. bruxellensis* ocorre com maior frequência durante a fermentação malolática ou durante a fase de maturação em barricas. Tal facto pode dever-se às condições extremas do meio, isto é, baixas concentrações de açúcares e altas concentrações de etanol, considerando também que esta levedura poderá ter uma maior afinidade a açúcares em comparação à *S. cerevisiae* (Blomqvist, J., 2015).

#### **2.4. Higiene e Segurança Alimentar na Produção de Vinho Branco**

Associados a este processo industrial estão uma série de riscos tanto para a segurança no trabalho como para a higiene e segurança do produto final. Para, então, se proceder a uma gestão dos riscos, o enólogo deve ter em conta a Regulamentação Nacional ou Comunitária, os Códigos de Boas Práticas de Higiene e Fabrico – sendo o exemplo do Codex Alimentarius, o Codex Enológico Internacional, o Código Internacional de Práticas Enológicas e o Manual de Boas Práticas de Produção Vitivinícola – e, de preferência, seguir as instruções de Normas de Segurança como a ISO 22000.

Com esses guias, o enólogo deve, pois, efetuar uma Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP). Este modo de teste trata-se de uma avaliação, identificação e subsequente controlo de possíveis situações de perigo ao longo do processo produtivo de um alimento. Os principais focos nesta análise são a composição do produto final, incluindo os seus aditivos, as condições de manutenção e armazenamento, a qualidade da matéria-prima, e os tipos de unidades processuais usados para a obtenção do produto final (Lelieveld, H. *et al.*, 2005).

Da mesma análise resultam Pontos de Controlo Críticos (PCC), que são situações que não são previstas por Códigos de Boas Práticas – não sendo então classificadas como pré-requisitos – e que podem causar danos à segurança ou saúde no caso de serem considerados significativos. Estes estão ainda divididos em perigos químicos, físicos e biológicos.

Para o processo produtivo do vinho, a existência de pragas ou doenças na matéria-prima e/ou na água de irrigação foi identificado como um perigo biológico, a presença de objetos estranhos aquando a colheita da uva é o exemplo de um perigo físico, sendo exemplos de perigos químicos a presença de resíduos de desinfetantes derivados dos tratamentos fitossanitários e herbicidas aquando a plantação da vinha, concentrações elevadas de sulfitos adicionados para controlo dos microrganismos e a presença de Ocratoxina A (OIV, 2012).

No que toca à utilização de aditivos aquando a produção de vinho, sendo o dióxido de enxofre considerado um aditivo de controlo microbiológico, há uma série de recomendações – incluindo a concentração diária recomendada – que deverão ser seguidas de maneira a que a sua adição possa ser então possível (FAO & WHO, 2016).

É ainda de salientar que a presença de toxinas como a Ocratoxina A no vinho final é fortemente devida à presença de espécies como a *A. carbonarius* e a *A. Niger* nas uvas desde a etapa da viticultura. Uma vez que concentrações excessivas impedem a utilização das uvas – com exceção de uvas afetadas com “podridão nobre” – deve-se recorrer a uma colocação da vinha mais apropriada, de modo evitar o contacto dos cachos de uva com o solo e os seus respetivos microrganismos e um melhor planeamento da data da vindima, evitando ainda o contacto com animais que possam ser fonte de contaminação das uvas (FAO, 2007).

#### **2.4.1. Desvantagens da Sulfitação**

Na tentativa de um controlo microbiano na produção do vinho, o método mais comumente usado pela comunidade vitivinícola é a adição de dióxido de enxofre. Este composto poderá ser adicionado na forma sólida (metabissulfito de potássio), gasosa ou, mais usualmente, na forma líquida (solução sulfurosa), e é conhecido por possuir propriedades antioxidantes e antissépticas, contribuindo também para a manutenção da cor e aromas do vinho durante a maturação. Este composto é capaz de impedir o desenvolvimento de leveduras, bactérias ácido-láticas e até algumas bactérias ácido-acéticas, conseguindo impedir reações como o apodrecimento causado por bactérias ou o crescimento de *Brettanomyces spp.*. Consegue ainda impedir a oxidação de

compostos do vinho e reações de escurecimento através da inativação de enzimas como a peroxidase.

A presença de sulfato de enxofre existe naturalmente no vinho sem haver a necessidade de qualquer tipo de adição. Tal facto deve-se à produção deste composto aquando a fermentação alcoólica por parte das leveduras fermentativas, através do consumo de enxofre livre na sua forma molecular ( $S_2$ ) durante a síntese de aminoácidos, ou à sua libertação na forma de sulfato de hidrogénio ( $H_2S$ ) – sendo esta a sua forma mais indesejada devido ao cheiro e ao sabor desagradáveis (Coimbra, M. *et al.*, 2012).

A capacidade de produção de dióxido de enxofre por parte de leveduras – sendo o exemplo da *Saccharomyces cerevisiae* – varia de espécie para espécie, mas pensa-se que possam divergir entre os 0 mg/L e os 115 mg/L. Nesse caso, o facto de este composto ser produzido pela célula pode ser cúmplice na resistência de certas leveduras ao aditivo de controlo microbiológico mais comum. Uma das soluções para este possível problema é o uso de estirpes de levedura que produzam pequenas quantidades de dióxido de enxofre (Puxeu, M. *et al.*, 2018).

Quantidades mínimas de  $SO_2$  livre resultarão numa ação pouco eficiente no controlo e manutenção do vinho, enquanto que concentrações excessivas irão causar alterações organoléticas e danos à saúde humana. Uma vez que o  $SO_2$  pode estar presente nos vinhos sobre a forma livre ou ligada, um método fiável de dosagem e controlo da concentração deste composto é dificultado. Porém, sabe-se que a sua forma ativa – forma com propriedades antimicrobianas e antioxidantes – é a forma molecular  $SO_2$  livre, que está dependente da disponibilidade da mesma e dos níveis de pH. (Coimbra, M. *et al.*, 2012).

Devido às reações adversas dos consumidores causadas pela presença quantidades significativas de dióxido de enxofre – que poderão manifestar-se na forma de dermatite alérgica, urticária, diarreia, e dificuldades na respiração – para além de uma perda das propriedades do vinho e, ainda, os obstáculos ambientais associados à remoção deste composto, tem sido feito um esforço para encontrar alternativas que possam substituir a utilização deste composto na vinificação (Puxeu, M. *et al.*, 2018). Alguns métodos que têm sido estudados encontram-se expostos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Métodos de controlo microbiano e respetivos mecanismos de ação, baseado na publicação de Bartowsky, E. J. (2009)

<b>Alternativas de Controlo Microbiano</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>
<b>Tradicional</b>	
Dióxido de enxofre	Inibe o desenvolvimento de microrganismos
Filtração	Remoção física dos microrganismos do vinho
<b>Química</b>	
Dicarbonato de dimetilo (DMDC)	Reação irreversível com os aminoácidos nos <i>sites</i> ativos das enzimas
<b>Produtos Naturais</b>	
Lisossomas	Impede a síntese de parede celular, levando à lise celular
Bacteriocinas	Modifica os componentes da parede celular, levando à lise celular

### **2.5. Processos Alternativos de Inativação Microbiológica de Vinhos**

Um dos maiores desafios da atualidade é a conceção de novas tecnologias e soluções que melhorem o bem-estar do consumidor, a qualidade e a segurança alimentar, e que simultaneamente contribuam para a defesa do planeta e uma menor pegada ecológica. Como já foi referido, a sulfitação do mosto de uva e/ou do vinho fermentado constitui um problema a nível económico, ambiental e um risco para a saúde; daí, portanto, ser considerado na área de investigação científica como uma oportunidade para a criação de novas e melhores opções para o controlo microbiológico do processo de fabrico do vinho.

**Tabela 3.** Métodos de controlo microbiano e respetivos mecanismos de ação, baseado na publicação de Bartowsky, E. J. (2009) (continuação)

<b>Tecnologias Recorrentes</b>	
<b>Ultrahigh pressure (UHP)</b>	Danifica a membrana citoplasmática, provoca a inativação enzimática
<b>Ultrassons de alta potência</b>	Causa o encurtamento da membrana celular, aquecimentos localizados e produção de radicais livres
<b>Irradiação UV</b>	Danifica o ADN
<b>Campos Elétricos Pulsados</b>	Provoca o colapso da membrana celular por efeitos elétricos

Vários esforços já foram então feitos numa tentativa de vir a solucionar este problema. De entre eles, destaca-se o trabalho realizado por Durner, D. *et al.*, que, em 2017, estudou os efeitos de inativação microbiológica de tratamentos com radiação ultravioleta em vinho e mosto de vinho. Nos seus ensaios foi então utilizado mosto de uva da variedade *Riesling* com a sua microflora nativa, sendo este tratado utilizando uma lâmpada de mercúrio através da qual a radiação UV-C máxima gerada era de 245 nm. Foi concluído que o nível de inativação das espécies presentes era dependente não só da espécie, mas também da concentração inicial das mesmas anterior ao tratamento. As leveduras provaram ser mais resistentes do que as espécies de bactérias presentes, sendo que a *Saccharomyces cerevisiae* mostrou ser a espécie mais resistente à irradiação. Foram obtidos efeitos de inativação dos microrganismos presentes semelhantes para o caso do tratamento usando radiação UV-C e para o caso da pasteurização, com a vantagem de a radiação UV-C não afetar a concentração de precursores de aroma do mosto e ser capaz de interromper a fermentação alcoólica mesmo na presença de açúcares residuais (Durner, D. *et al.*, 2007).

Alternativamente, Chen, P. *et al* em 2006 estudou as altas pressões hidrostáticas (HHP) na pasteurização de vinho com baixo teor alcoólico. A temperatura foi mantida a 25 °C enquanto que a pressão foi colocada entre os  $101,3 \cdot 10^3$  kPa e os  $354,64 \cdot 10^3$  kPa durante 0 min até 30 min,

analisando-se a concentração de bactérias aeróbias, leveduras e bactérias ácido-láticas e ainda propriedades sensoriais do vinho tratado através de 10 painéis de teste (apenas para o vinho tratado a  $354,64 \cdot 10^3$  kPa por 10 min). A concentração de bactérias aeróbias foi considerada nula a partir dos 20 min de tratamento a  $303,98 \cdot 10^3$  kPa e a partir dos 10 min de tratamento a  $354,64 \cdot 10^3$  kPa, o mesmo efeito de inativação foi observado para as bactérias ácido-láticas a partir dos 20 min a uma pressão de  $303,98 \cdot 10^3$  kPa ou a partir dos 5 min a  $354,64 \cdot 10^3$  kPa; enquanto que para as leveduras apenas com pressões superiores a  $303,98 \cdot 10^3$  kPa é que se verificou tal efeito. Foi possível constatar que através da conceção da cinética de inativação dos microrganismos que poderiam estar presentes dois grupos distintos de microrganismos no vinho, sendo um deles mais suscetível a este tipo de tratamentos uma vez que a taxa de inativação nas etapas iniciais era superior em relação às finais. Concluiu-se igualmente que os tratamentos a HHP não tiveram impacto nas características físico-químicas do vinho (Chen, P. *et al*, 2006).

### **2.5.1. As Eletro-Tecnologias Nos Processos de inativação**

No que toca a tecnologias recorrentes no âmbito de bioprocessos e de interesse tanto para a investigação científica como para a indústria, é de salientar as tecnologias que envolvem a utilização de corrente elétrica como vetor de processamento. De facto, estas tecnologias englobam em si um extenso espetro de aplicações e uma série de vantagens desde a estabilização de biomateriais, a facilitação da extração de componentes à assistência nos processos de separação. Alguns dos efeitos decorrentes da aplicação de campos elétricos envolvem a dissipação de parte da energia sob a forma de calor – fenómeno conhecido como Efeito de Joule ou aquecimento óhmico – e a eletroporação, que se refere ao fenómeno que ocorre devido à capacidade do campo elétrico pulsado de elevada intensidade provocar uma permeabilização da membrana celular causada pela geração de um potencial transmembranar (Santos, P., & Rodrigues, R., 2018).

Efetivamente, dependendo do objetivo e das diferentes condições de aplicação e equipamento, diferentes protocolos elétricos podem ser estabelecidos. Atualmente, as principais tecnologias baseadas na aplicação de campos elétricos encontram-se divididas numa variedade de espetros, diferenciando-se entre si pelos seguintes fatores: tipo de corrente utilizada, intensidade da força do campo elétrico, frequência e tipo de onda elétrica, tempo de tratamento e o efeito térmico. Deste modo, estas tecnologias poderão ser divididas em: Aquecimento Óhmico (OH), Aquecimento Óhmico Pulsado (POH), Campos Elétricos Moderados (MEF), Campos Elétricos Pulsados (PEF) e Descargas Elétricas de Alta Voltagem (HVED).

No que diz respeito às HVED, caracterizadas por pulsos de alta corrente e alta voltagem, é promovida a eletroporação e dissipação de calor e ainda é comum ocorrerem fenômenos como a cavitação, emissão de luz, efeito de choque e formação de radicais. Desafios associados a esta tecnologia baseiam-se na demanda e custos dos materiais e equipamentos e limitações relacionadas à operação em si (Santos, P., *et al*, 2018).

A tecnologia PEF é provavelmente mais estudada no que diz respeito a métodos de extração. Através desta tecnologia, considerada como sendo não-térmica, são aplicados pulsos elétricos na ordem dos quilovolts por centímetro, em intervalos de tempo curtos (nanossegundos), provocando assim a eletropermeabilização da membrana e a danificação de estruturas intracelulares que podem determinar a lise celular. Os fatores que contribuem para a eficiência desta técnica estão relacionados com o tipo de pulso (unipolar ou bipolar), número de pulsos por unidade de tempo, a sua duração, a temperatura de operação e as características do próprio produto e meio. Atualmente, tem-se verificado a tendência para tornar os PEF, um processo essencialmente reconhecido como sendo não-térmico, num processo que envolva o efeito da temperatura. Esta nova tendência tem concebido novos estudos, que denominam esta variante de Aquecimento Ôhmico Pulsado (POH).

Para além das técnicas que usem corrente elétrica pulsada, existem técnicas que se servem da aplicação de campos elétricos sem restrições do tempo de aplicação, formato de onda e frequência elétrica. São o exemplo disso o MEF e o OH, que se caracterizam ambas pela aplicação de campos elétricos de baixa ou moderada intensidade sem restrições no tempo de tratamento, e cujo efeito térmico pode ser controlado ou minimizado (no caso do MEF) ou direcionado para processamento térmico (caso do OH). Ambas técnicas utilizam corrente elétrica alternada, sendo que, por esta razão, normalmente a sua aplicação resulta na dissipação significativa de calor. OH e MEF só se diferenciam pela questão do efeito térmico; no caso do MEF, o aquecimento por efeito de Joule pode ser minimizado, limitando a condutividade elétrica do meio, procurando-se desta forma dar relevo aos efeitos elétricos decorrentes da tecnologia; em sentido contrário no caso do OH, pretende-se assumidamente acentuar a dissipação de calor. De facto, tanto o MEF como o OH são técnicas com condições de implementação mais facilitadas ao contrário de outras eletro-tecnologias mencionadas anteriormente, ainda com a faceta de permeabilizar a membrana e induzir a extração de compostos (análise caso a caso), podendo ser usados numa variedade de aplicações.

Ao longo dos anos, este tipo de tecnologias tem sido, então, cada vez mais estudado, bem como a sua aplicação na indústria dos vinhos. Boussetta, N. *et al.*, em 2015, estudou o efeito de inativação dos PEF e HVED em *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus* e *Brettanomyces bruxellensis*, presentes em vinho tinto (com a exceção de *O. oeni* e *P. parvulus* para o tratamento a HVED), bem como o seu efeito na qualidade do vinho. Para tal, foram utilizados os tempos de tratamento 1, 2, 4, 6, 8 e 10 ms e voltagens de 20 kV/cm e 40 kV/cm para o tratamento usando PEF e HVED, respetivamente. Foram também estudados diferentes parâmetros físico-químicos nos vinhos, nomeadamente o pH, a concentração de açúcares residuais, concentração de ácido láctico, ácido tartárico e ácido málico, bem como a sua acidez total, acidez volátil e concentração em taninos e antocianinas, entre outros parâmetros. Houve, então, a inativação da *B. bruxellensis*, *O. oeni* e *P. parvulus* para ambos os tratamentos, sendo que para o tratamento a PEF esta inativação foi mais bem-sucedida; também no que diz respeito aos parâmetros físico-químicos, verificou-se que os tratamentos a PEF não terão tido um impacto negativo na composição do vinho final, ao contrário dos tratamentos a HVED (Boussetta, N. *et al.*, 2015).

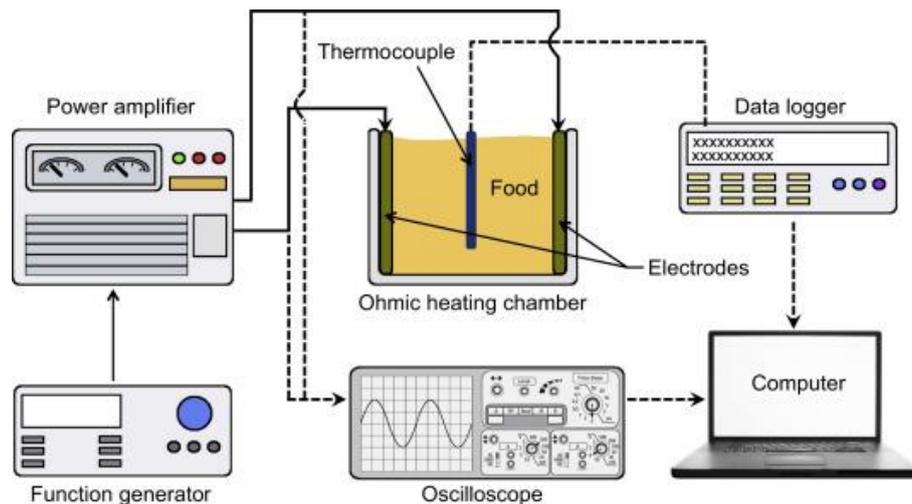
Mok, C. *et al.*, em 2018, também aplicou o conceito das eletro-tecnologias – nomeadamente os PEF – no tratamento de vinho tinto de baixo teor alcoólico. Para tal, foram utilizados sete elétrodos ligados em série por onde se fizeram passar correntes de alta voltagem em pulsos de 1  $\mu$ s, com o campo elétrico a variar entre os 20 kV/cm e os 50 kV/cm e uma frequência entre os 500 Hz e os 1500 Hz. Espécies de leveduras provaram ser mais suscetíveis a este tipo de tratamento, seguidas por espécies de bactérias aeróbias e, por último, bactérias ácido-láticas. Verificou-se uma maior taxa de morte celular entre os 30 kV/cm e os 40 kV/cm com a frequência a variar entre os 500 Hz e os 1500 Hz. No que diz respeito aos valores  $D$  para a frequência da corrente elétrica necessária para reduzir o número de microrganismos, as leveduras apresentaram um valor menor em comparação com os restantes microrganismos, seguidas por bactérias acéticas e, por último, as bactérias ácido-láticas. Já o valor  $D$  que relaciona a frequência com o tempo de tratamento foi menor para as leveduras, sendo que ambos os valores  $D$  foram inversos à intensidade do campo elétrico. O valor  $z$  que relaciona a frequência com o tempo de tratamento revelou ser mais baixo para as bactérias ácido-láticas, cerca de 24,6 kV/cm, e mais alto para as leveduras, cerca de 46,8 kV/cm (Mok, C. *et al.*, 2018).

## 2.6. Aquecimento Óhmico (OH)

O OH a tecnologia com maior eficiência de implementação na indústria, nomeadamente na pasteurização e esterilização de alimentos (Santos, P., *et al*, 2018). Aquecimento Óhmico, ou aquecimento de Joule, é um mecanismo versátil que emprega energia elétrica no tratamento de uma variedade de produtos, tendo a particularidade de ocorrer a conversão quase total da energia elétrica empregue em energia térmica, causada pela resistência elétrica dos materiais e meio, e consegue ainda fornecer um aquecimento homogêneo das partículas do meio que está a tratar (Kaur, N. *et al*, 2016). Neste mecanismo é necessário o contacto entre os elétrodos e o meio condutor (produto alvo) de forma a permitir a passagem de corrente e dissipação de calor no seu interior; este é por isso um processo de aquecimento direto, sendo que o calor gerado no produto, não sendo transferido através de superfícies quentes (métodos indiretos). O seu modo de ação também tem a vantagem de evitar a degradação de compostos sensíveis ao calor – sendo eficientemente apto a conservar a qualidade do alimento – e evitar a formação de incrustações e sujidades proteicas (efeitos de fouling).

Entre outros parâmetros, este mecanismo depende da condutividade elétrica do produto, do formato em que o mesmo atravessa pelo sistema, o respetivo tempo de residência e da intensidade do campo elétrico. O seu *design* baseia-se num certo número de componentes-chave, exemplificados na Figura 2, sendo estes um gerador de energia (ligado a um amplificador de sinal, ou não) e ligado a dois elétrodos que se encontram posicionados de modo a que estejam em contacto com o produto e distanciados o suficiente para poderem efetuar o tratamento no mesmo, mas não o suficiente de modo a que a intensidade da corrente aplicada seja mínima. Ainda deverá ter uma unidade de controlo da voltagem aplicada e um sistema de aquisição de dados. Tradicionalmente, este método é usado em reatores tipo *batch*, mas existem *designs* especificamente criados de modo a que esta operação possa decorrer em contínuo (Bawa, A. *et al*. 2014).

A condutividade elétrica do produto a tratar é um parâmetro crítico desta tecnologia, que define a apetência de aplicação assim como taxas e eficiência de aquecimento. A condutividade elétrica é um parâmetro dependente da estrutura e do tipo de ligações químicas presentes na matriz alimentar – parâmetros como a força iónica e presença de iões aumentam os valores de condutividade elétrica. Sabe-se também que o aumento da temperatura por efeito de Joule é proporcional ao aumento da condutividade elétrica do produto, estando este parâmetro então



**Figura 2** Esquema exemplificativo de um sistema de aquecimento ôhmico, retirado de Melton, L. *et al.*, 2019.

associado à eficiência do tratamento.

Outros parâmetros a considerar são: a frequência elétrica – baixas frequências elétricas podem promover a corrosão dos elétrodos dependendo do tipo de material e condutividade elétrica do meio; a voltagem e/ou campo elétrico aplicada – que irá definir a taxa de aquecimento; composição do alimento – se a matriz não for homogênea, o aquecimento poderá não ser uniforme; e a viscosidade do fluido, que pode influenciar o aquecimento, nomeadamente valores maiores de viscosidade tendem a aquecer mais depressa.

Esta tecnologia está, portanto, associada a um número de vantagens, revelando-se uma alternativa atrativa para processos como de inativação microbiana. Algumas dessas vantagens são os baixos custos associados à sua manutenção e custos de operação, a sua elevada eficiência no tratamento de uma grande variedade de produtos, tanto líquidos como sólidos, associados a um baixo risco da ocorrência de danos no alimento provocados por efeito do calor (Bawa, A. *et al.* 2014). Neste sentido, foram já vários os estudos feitos com o objetivo de aprofundar o conhecimento acerca desta tecnologia e a sua possível aplicação em processos industriais.

Pereira, *et al.*, em 2007, determinou a cinética de morte da bactéria *Escherichia coli*, em leite cru com recurso ao aquecimento ôhmico. Os resultados foram comparados com o tratamento térmico convencional – sendo que os perfis térmicos foram mantidos idênticos

Foram testadas as temperaturas 55 °C, 63 °C, 65 °C, 67 °C e, adicionalmente, 70 °C para o caso do tratamento convencional. Dos ensaios resultaram valores *D* para as amostras submetidas a tratamento ôhmico inferiores em comparação aos valores *D* das amostras tratadas

pelo método convencional, sendo a única exceção o caso em que a temperatura de ensaio foi de 55 °C. Já para o valor z, este foi superior no caso das amostras tratadas pelo método convencional relativamente ao tratamento óhmico. Foi então possível aferir que o tratamento óhmico foi mais eficaz na inativação da *E. coli* nas amostras de leite cru do que o tratamento pelo método convencional. Uma vez que ambos os tratamentos foram realizados sob o mesmo perfil térmico, as diferenças atribuídas foram justificadas pela presença do campo elétrico. Concluiu-se que, neste caso, o OH teve um efeito elétrico adicional na inativação do microrganismo (Pereira, R. *et al*, 2007).

Ainda em 2017, Kima, N. *et al.* estudou o efeito de inativação do aquecimento óhmico em esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, inoculada em sumo de maçã, comparando-o também ao aquecimento convencional. 50 kg de sumo de maçã foram inoculados com *A. acidoterrestris*, sendo posteriormente sujeitos a tratamentos com temperatura variável entre os 85 °C e os 100 °C durante intervalos de tempo de tratamento de 30 s a 90 s, sendo ainda sujeitos a uma potência elétrica de 26,7 V/cm e uma frequência de 25 kHz exclusivamente quando se tratava do tratamento óhmico. Com a utilização de cinco tratamentos sequenciais, o aquecimento óhmico provou ser uma alternativa mais eficiente para a inativação de *A. acidoterrestris* do que o aquecimento convencional nas mesmas condições, sendo que as condições otimizadas de inativação revelaram ser 100 °C a um intervalo de tempo de 30 s (Kima, N. *et al.*, 2017).

### **3. Metodologias**

O seguinte capítulo encontra-se dividido em quatro secções distintas. A secção 3.1 refere-se às análises microbiológicas feitas durante o decorrer do projeto; a secção 3.2 refere-se aos ensaios de aquecimento óhmico realizados com o objetivo de inativação da levedura-alvo; a secção 3.3 secção é relativa aos métodos usados para a caracterização do mosto; e, por último, a secção 3.4 descreve as metodologias usadas para monitorizar a fermentação do mosto.

Para a análise dos resultados, foi utilizado o programa GraphPad Prism 7, em que foi considerado um intervalo de confiança de 95 % para análise estatística. No caso da comparação de dois grupos de dados foi utilizado o teste *t*-Student, sendo que para a comparação de mais de dois grupos de dados foi usada a análise de variâncias ANOVA. As amostras cujos parâmetros apresentaram diferenças significativas entre si encontram-se expostos com letras diferentes junto desses dados.

#### **3.1. Microbiologia**

A metodologia experimental decorreu, sempre que possível e necessário em condições de assepsia, através da esterilização do material e soluções em autoclave, ou ainda usando membranas de filtração de 22 µm aquando a primeira opção não era possível. O trabalho, envolvendo plaqueamentos e inoculações, foi realizado numa câmara de fluxo laminar.

##### **3.1.1. Preparação de Meios de Cultura**

Para a preparação de inóculos e stocks da levedura PYCC 4801 foi preparado o meio YPD de acordo com o método OIV-MA-AS4-01, enquanto que para a identificação das espécies presentes no mosto e seguimento da fermentação alcoólica foi utilizado o meio WL – cuja composição se encontra descrita no Anexo I. Para ambos os meios, os componentes secos foram primeiro pesados e depois foi adicionada a água destilada, sendo a mistura seguidamente autoclavada durante 20 min até uma temperatura de 120 °C e, adicionalmente, para os meios contendo agar, foram vertidos para placas de Petri com diâmetro de 90 mm.

### 3.1.2. Preparação de *Stocks* de Levedura

Foi preparado um pré-inóculo de *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801 inoculando cerca de 10 µL de levedura recolhidos com uma ansa em 20 mL de meio YPD esterilizado, sendo seguidamente incubado a uma temperatura de 28 °C com agitação de 120 rpm. Após 48 h, o mesmo inóculo foi adicionado a 50 mL de meio YPD, voltando a incubar este novo inóculo nas mesmas condições durante um período de tempo de três a quatro dias. No final, retiraram-se amostras do inóculo para sucessivo plaqueamento em meio YPD sólido, sendo estas amostras incubadas a 28 °C durante quatro dias de modo a permitir o crescimento de colónias. Essas mesmas colónias eram depois removidas das placas através da sua diluição numa solução de 50 % de meio YPD, 30 % de água ultra-pura e 20 % glicerol, de modo a serem pipetadas em frascos de criopreservação para armazenamento e manutenção a longo prazo a -80 °C.

### 3.1.3. Caracterização Microbiológica das Amostras

Seguindo as indicações dadas pelo método OIV-MA-AS4-01, as amostras foram diluídas, sempre que necessário e em condições de assepsia, em seqüências de dez vezes, inoculando o meio sólido em placas num volume de 0,1 mL, subseqüentemente espalhando-o até este ser absorvido. As mesmas placas foram invertidas e incubadas a 28 °C por um período de crescimento de quatro dias.

No que toca à concentração microbiológica das amostras ( $CM$ ), esta foi calculada utilizando o número de colónias presentes em placa ( $n$ ), o fator de diluição ( $f$ ) e o volume de amostra plaqueado ( $vol$ ). Esta equação encontra-se representada na Equação 1.

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

Aquando o tratamento do mosto utilizando o aquecimento óhmico, foi calculada a percentagem de inativação obtida através da comparação da concentração de microrganismos das amostras tratadas ( $t$ ) e não-tratadas ( $c$ ) de acordo com a Equação 2.

$$p. i. = \frac{CM_c - CM_t}{CM_c} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Para a contagem celular em microscópio ótico (H550S, Nikon, Japão) foi usada uma câmara de Neubauer com duas câmaras individuais para contagem (0640010, Marienfeld

Superior, Alemanha), e para isso foram pipetados cerca de 10 µL de amostra para cada uma das câmaras e recorreu-se à ótica Plan 60X/0,65 para a contagem das células visíveis dos quatro quadrantes nos limites de cada câmara, mais o respetivo quadrante central.

A concentração celular de cada amostra pode ser calculada pelo número de células contadas nos cinco quadrantes ( $\bar{c}$ ) e fator de diluição (f) utilizando a Equação 3.

$$\frac{\text{células}}{\mu\text{L}^{-1}} = \frac{\bar{c}}{0,2 \times 0,1} \times f \quad \text{Equação 3}$$

Já para a estimativa da percentagem de células mortas, foi usada uma solução de azul de metileno – preparada segundo CSH Protocols (2019) – colocando 100 µL da solução em 1 mL de inóculo e esperando cerca de 10 min antes de ser feita a pipetagem para a câmara de Neubauer. Foram contados o número de células total e o número de células mortas (ou seja, células apresentando uma coloração azulada), de modo a ser efetuado o cálculo da concentração destas, seguindo a fórmula da Equação 4.

$$c. m. = \frac{\text{células mortas}}{\text{células totais}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

#### **3.1.4. Utilização da Levedura-Alvo**

Para os ensaios envolvendo a levedura PYCC 4801, inoculou-se o *stock* de levedura previamente preparado em meio YPD, incubando-se por um período de três a cinco dias a 28 °C e agitação de 120 rpm.

#### **3.2. Ensaios de Inativação Utilizando o Aquecimento Óhmico**

Primeiramente, foram feitos ensaios com a estirpe de levedura PYCC 4801. Para estes ensaios, foi utilizado um reator tubular de vidro com camisa de arrefecimento colocado sobre uma placa de agitação com um termopar do tipo K colocado de modo a mergulhar no inóculo. Os eletrodos – colocados em cada extremidade do reator – tinham 3,8 cm<sup>2</sup> de área superficial e um espaçamento de 1 cm, sendo possível tratar cerca de 5,5 mL de cada amostra em cada tratamento, após uma prévia desinfeção deste com etanol 70 % e duas lavagens com água ultra-pura. Os dados da intensidade da corrente foram medidos usando um osciloscópio industrial (125, Fluke Corporation, Estados Unidos da América), o gerador do sinal elétrico variou consoante o

protocolo e o mesmo aconteceu com a presença do amplificador de sinal. Todos os plaqueamentos foram realizados em triplicado em meio YPD.

A condutividade elétrica das amostras em cada ensaio foi calculada segundo a Equação 5.

$$\sigma = \frac{I}{V} \times \frac{d}{A} \quad \text{Equação 5}$$

Para os ensaios com a levedura PYCC 4801, foram criados quatro protocolos distintos, cujos fundamentos e objetivos encontram-se ilustrados na Tabela 4. Todos os ensaios seguiram as premissas expostas, algumas na sua integridade, outras apenas testando algumas das condições de operação referidas.

**Tabela 4.** Metodologias aplicadas a inóculos de levedura de *D. bruxellensis* PYCC 4801, expondo as suas condições de operação específicas e objetivos gerais

<b>Protocolo</b>	<b>Matriz</b>	<b>Tempo de Tratamento</b>	<b>Condições de Operação</b>	<b>Objetivos</b>
<b>I</b>	Inóculo lavado três vezes	Intervalo de tempo somado até atingir 60 min de tratamento em que o sistema se encontrava ligado	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperatura de tratamento de 40 °C</li> <li>- Campo elétrico de 650 V/cm</li> <li>- Amostras de 200 µL diretamente no reator em intervalos de 10 min, fazendo simultaneamente o registo da intensidade da corrente para esses tempos de amostragem</li> </ul>	Reduzir o efeito térmico através da utilização de inoculo isento de sais na composição
<b>II</b>	Inóculo lavado três vezes	Intervalo de tempo de tratamento somado até atingir os 20 min de tratamento em que o sistema estava ligado	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tratamentos a 40 °C, 75 °C e 90 °C</li> <li>- Campo elétrico de 400 V/cm e 600 V/cm</li> <li>- Comparação com o tratamento convencional utilizando a mesma temperatura de teste</li> </ul>	Avaliar a sinergia do campo elétrico a diferentes temperaturas com inoculo isento de sais na composição

**Tabela 4.** Metodologias aplicadas a inóculos de levedura de *D. bruxellensis* PYCC 4801, expondo as suas condições de operação específicas e objetivos gerais (continuação)

<b>Protocolo</b>	<b>Matriz</b>	<b>Tempo de Tratamento</b>	<b>Condições de Operação</b>	<b>Objetivos</b>
<b>III</b>	Inóculo lavado três vezes, com ajuste de condutividade elétrica através da utilização de solução PBS (MM = 411 g/mol),	Intervalo de tempo de tratamento somado até atingir os 20 min de tratamento em que o sistema estava ligado	- Tratamento a 40 °C - Campo elétrico a 400 V/cm e 600 V/cm	Uniformizar condições de tratamento através do controlo da condutividade elétrica
<b>IV</b>	Diluição dos inóculos numa proporção de 1:10 em água ultra-pura, sem se proceder a nenhuma lavagem	Intervalo de tempo de tratamento total de 20 min	- Comparação do tratamento convencional ao tratamento ôhmico a campos elétricos baixos e campos elétricos moderados (400 V/cm) - Temperatura de tratamento de 40 °C, 75 °C e 90 °C	Ajuste da condutividade elétrica com o próprio meio de inóculo. Avaliação da influência do campo elétrico e aumento da densidade de corrente elétrica

Foram ainda adotadas algumas terminologias de modo a remeter às condições de tratamento que foram sistematicamente adotadas em vários ensaios, as quais estão esclarecidas na Tabela 5.

O tratamento era controlado através da variação da temperatura, captada através do programa FlukeView™, que era variada entre os 12 °C – uma temperatura baixa – e a temperatura de tratamento (ligando-se o sistema quando o objetivo era subir a temperatura e desligando-se o sistema quando o objetivo era baixar a temperatura). O abaixamento da temperatura foi auxiliado por uma camisa de arrefecimento ligada a um banho de água a 4 °C para o Protocolo I e 2,5 °C para os restantes protocolos.

No que diz respeito às lavagens do inóculo, foram utilizados os *stocks* de levedura com concentrações celulares conhecidas, colocando-os em água ultra-pura até fazer os 10 mL em *falcons* de 15 mL. Esse inóculo foi então centrifugado a 5000 rpm por 10 min, retirando o respetivo sobrenadante no final e adicionando novamente água ultra-pura, para a realização de

**Tabela 5.** Terminologia referente às condições de ensaio a que foram submetidas as amostras testadas

<b>Terminologia</b>	<b>Temperatura de Tratamento/°C</b>	<b>Intensidade do Campo Elétrico/V·cm<sup>-1</sup></b>
<b>OAV</b>	40	45
<b>OBV</b>	75	45
<b>OAW</b>	40	90
<b>OBW</b>	75	
<b>OAX</b>	40	400
<b>OBX</b>	75	
<b>OCX</b>	90	
<b>OAZ</b>	40	600
<b>OBZ</b>	75	
<b>OCZ</b>	90	
<b>CA</b>	40	
<b>CB</b>	75	

cada lavagem. No final, os inóculos centrifugados eram vertidos para um matraz de 200 mL esterilizado.

Com exceção do Protocolo I, todos os ensaios foram realizados em triplicado, como repetições verdadeiras, sendo as amostras retiradas na sua totalidade para *falcons* de 15 mL no final de cada tratamento, procedendo-se seguidamente ao seu plaqueamento em triplicado.

Ainda, no Protocolo IV, foram comparados o tratamento convencional, o tratamento óhmico com campos elétricos baixos (< 100 V/cm) e o tratamento óhmico com campos elétricos moderados (> 0.4 kV/cm). No que diz respeito ao método convencional, 10 mL de inóculo foram colocados em *falcons* de 15 mL e, seguidamente, colocados num banho de água também nas temperaturas de 40 °C, 75 °C e 90 °C, juntamente com um *falcon* com 10 mL de água onde estava mergulhado um termómetro digital, por onde era feito o controlo da temperatura. O tempo de tratamento era controlado com o auxílio de um cronómetro digital.

Já para os inóculos submetidos a um tratamento óhmico a uma voltagem baixa, os elétrodos eram ligados a um gerador de sinal (33220<sup>a</sup>, Agilent Technologies Inc., Estados Unidos da América) – onde o tipo de onda escolhido foi o sinusoidal e a frequência de operação fixou-se nos 50 kHz – a um amplificador de sinal (CS 3000, Peavy Electronics Corporation, Estados Unidos da América), que ampliava a voltagem do gerador 30 vezes.

Foi realizado ainda um estudo do tempo de prateleira após a realização do Protocolo IV, onde as amostras em triplicado foram deixadas a uma temperatura de 5 °C, às quais que foram retiradas amostras de 200 µL de modo a supervisionar o desenvolvimento microbiano através da leitura da respetiva absorvância a 600 nm, e plaqueamentos em triplicado sempre que se observava uma alteração do valor da absorvância.

### **3.2.1. Avaliação em Mosto de Vinho Verde**

Com base nos resultados obtidos anteriormente e nas condições mais promissoras, foram ainda realizados ensaios de inativação microbiológica em mosto de vinho. Para tal, utilizou-se o mesmo sistema de tratamento óhmico que nos ensaios anteriores, com um reator cilíndrico de capacidade de 500 mL e com elétrodos de área superficial de 49 cm<sup>2</sup> e um afastamento de 8 cm. De modo a tratar, no mínimo, 1 L de mosto, foram feitos quatro tratamentos de 250 mL ou 300 mL. Estes foram submetidos a um tratamento a 40 °C, 400 V por um período de 20 min, sendo o conteúdo do reator vertido para um matraz de 2 L esterilizado. Foram também realizados estudos de tempo de prateleira para os dois primeiros tratamentos, mantendo as amostras de mosto tratado e mosto não-tratado a 25 °C e 5 °C, respetivamente para cada tratamento.

No final, 1 L de mosto tratado por OH e 1 L de mosto não tratado (controlo) foram colocados em matrizes de 2 L para posterior fermentação (ver secção 3.4).

### **3.3. Caracterização Físico-Química do Mosto de Vinho**

As amostras de mosto foram submetidas a uma série de ensaios de maneira a averiguar quais as suas características intrínsecas anteriores ao processo de fermentação. Esses ensaios foram, respetivamente, a determinação dos Sólidos Solúveis Totais (SST), teor proteico, concentração de açúcares redutores (AR), acidez titulável (AT) e medição de pH.

Numa tentativa de aproximar a caracterização ao que já foi feito, o teor de sólidos solúveis totais foi determinado de acordo com o método OIV-MA-AS2-02, utilizando um refratómetro digital HI 96801 (Hanna Instruments, Itália); o teor proteico foi quantificado de acordo com o protocolo

B para microplacas do Kit Coomassie (Bradford) Protein Assay (Thermo Fischer Scientific™, Estados Unidos da América), onde foi concebida uma curva de calibração segundo as recomendações nele incluídas e cuja equação se encontra representada na Equação 6, com o respetivo coeficiente de correlação de valor 0,9799.

$$\frac{TP}{(\text{mg/L})^{-1}} = \frac{Abs_{595nm} - 0,0017}{0,0184} \quad \text{Equação 6}$$

A determinação da concentração em açúcares redutores foi feita empregando o método do DNS, sendo que, para tal, foi construída uma curva de calibração utilizando glucose em concentrações de 1,2 g/L a 120 g/L e cuja equação se encontra descrita na Equação 7 com um coeficiente de correlação de 0,9961.

$$\frac{AR}{(\text{g/L})^{-1}} = \frac{Abs_{540nm} - 0,02997}{0,35631} \quad \text{Equação 7}$$

Para o cálculo da acidez total, expressa em gramas de ácido tartárico, utilizou-se o método OIV-MA-AS313-01. Foi então usada uma solução indicadora de azul de bromotimol – obtido através da dissolução de 10 mg de azul de bromotimol em 10 mL de etanol 96 %, sendo esta mistura adicionada a 10 mL de água destilada – e uma solução aquosa de NaOH, com uma concentração de 0,1 mol/L, para a titulação utilizando amostras de mosto. A equação seguinte representa a relação entre o volume titulado da solução de NaOH registado aquando a obtenção da coloração azul-verde e a correspondente acidez total do mosto.

$$\frac{AT}{(\text{g/L})^{-1}} = \frac{V_{NaOH}}{\text{mL}} \times 10 \times 0,075 \quad \text{Equação 8}$$

Por último, foi medido o pH através de um potenciómetro digital equipado com elétrodo de vidro (HI 2210, Hanna Instruments, Itália) calibrado com soluções padrão de pH 4, pH 7 e pH 9.

### **3.4. Fermentação do Mosto de Vinho Verde**

Numa tentativa de microvinificação do mosto de vinho, foi primeiro preparado um inóculo de levedura fermentativa. Foram adicionados 100 mL de uma solução de glucose e frutose a 100 mL de água a 50 °C, sendo seguidamente diluídos 1 g de mistura de nutrientes (alfa Collection Nutrient Mix)– tanto para a solução como para cada um dos matrizes de mosto – e, por fim,

adicionados 10 g de levedura desidratada (alfa Collection KB12). O inóculo foi deixado em repouso durante 30 min de modo a reativar a levedura, removendo 1 mL para fazer a contagem do número de células na câmara de Neubauer – explicado no ponto 3.1 – de modo a prever a concentração inicial de células ativas que se inocula em cada matraz de mosto, sendo que, por último, foi adicionado 10 mL do inóculo em cada matraz de 1 L de mosto.

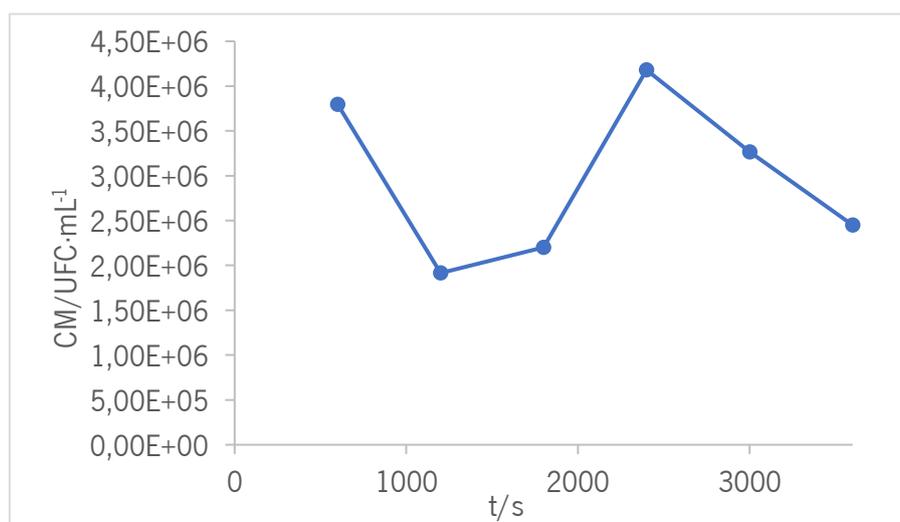
No que toca ao seguimento da fermentação para matrizes com 1 L de mosto, foram utilizadas cinco abordagens diferentes de maneira a conseguir uma maior aproximação à realidade. Estas foram então a medição do pH e temperatura – utilizando uma metodologia semelhante à usada para a caracterização do mosto, no ponto 3.3 – seguida de uma pesagem do matraz, havendo este sido pesado vazio previamente ao enchimento com mosto de modo a se obter apenas o peso do mosto. Também foi determinada a concentração de açúcares redutores, utilizando o mesmo método descrito no ponto 3.3, foi medida a absorvância num espetro de 400 nm a 600 nm, com um intervalo de 10 nm, de uma amostra de 200 µL do mosto para análise de cor, e foi ainda medida a densidade com a ajuda de um densímetro – verteu-se 250 mL de mosto para uma proveta graduada, mergulhou-se o densímetro até à base da proveta – registando a medição do valor após estabilização. Para o registo da temperatura do mosto utilizou-se um termómetro digital tipo vareta.

## 4. Resultados e Discussão

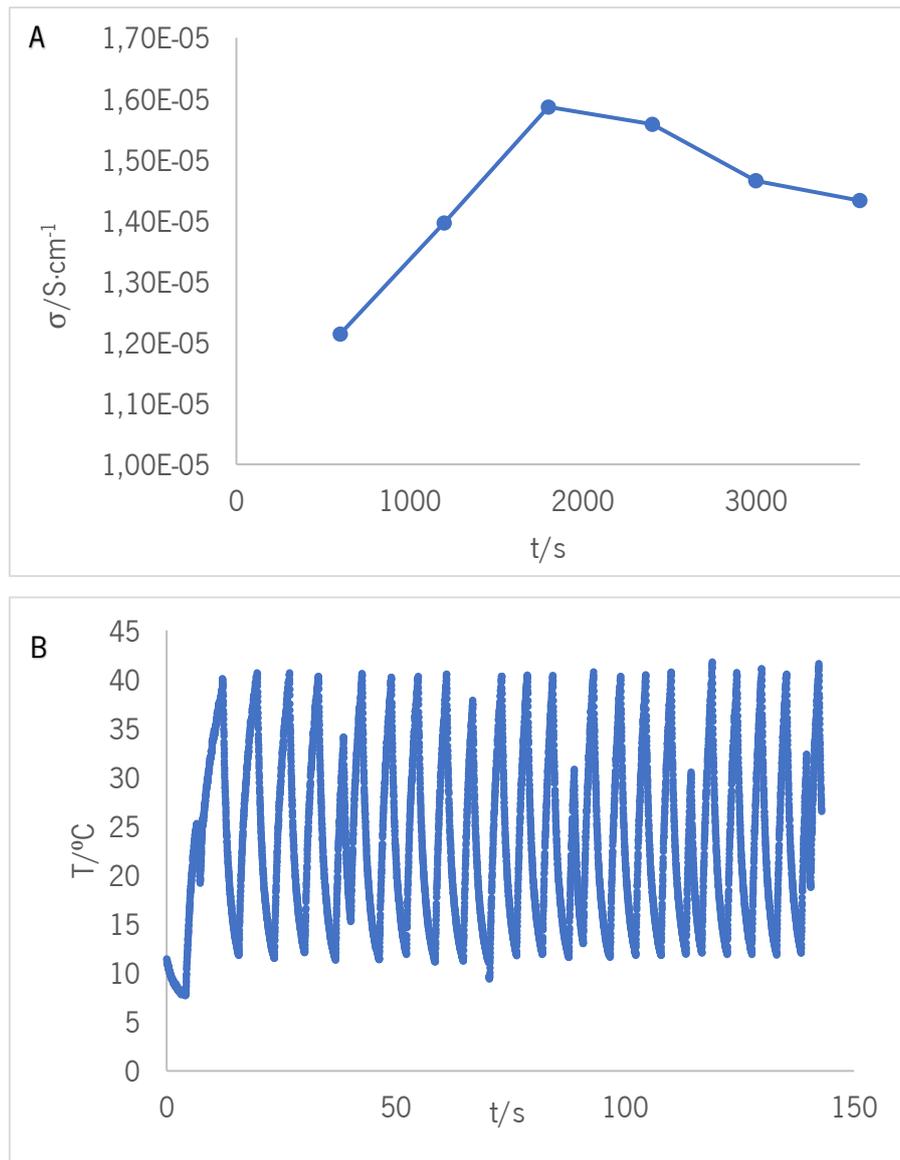
### 4.1. Avaliação Preliminar Em Levedura Isolada – Protocolo I

De acordo com o Protocolo I, foram realizados tratamentos a 40 °C com campo elétrico de 400 V/cm de maneira a testar os efeitos do tratamento ôhmico num inóculo de levedura PYCC 4801. A Figura 3 ilustra a variação da concentração celular em função do tempo total de tratamento, sendo que a aplicação do campo elétrico foi realizada por pulsos de forma a minimizar o efeito da temperatura e aumentar o tempo útil de exposição ao campo elétrico, que neste caso foi de 20 min; o restante tempo deve-se aos ciclos de refrigeração (ver Figura 4.B).

Analisando o gráfico da Figura 4.A, vê-se um aumento da condutividade elétrica até ao 30, juntamente com um declínio da concentração celular aos 10 min e 20 min, sendo que aos 30 min ocorre um aumento da concentração celular, seguida de outro declínio. Seria de esperar que ocorresse uma diminuição da concentração celular ao longo do tempo de tratamento, juntamente com um aumento da condutividade elétrica. O máximo de concentração celular que se verifica aos 30 min poderia ter sido provocado por uma contaminação do inóculo, contudo não se verifica tal acontecimento em placa. Também poderá ter sido devido a uma má homogeneização do inóculo, resultando numa concentração celular desproporcionada ao verdadeiro comportamento do inóculo. O aumento da condutividade elétrica pode dar a indicação de perda da integridade celular da levedura, promovendo assim a migração de compostos para a solução, à imagem do que acontece quando ocorre eloporação.



**Figura 3** Variação da concentração celular para amostras do inóculo de PYCC 4801 retiradas dos 0 min aos 60 min.

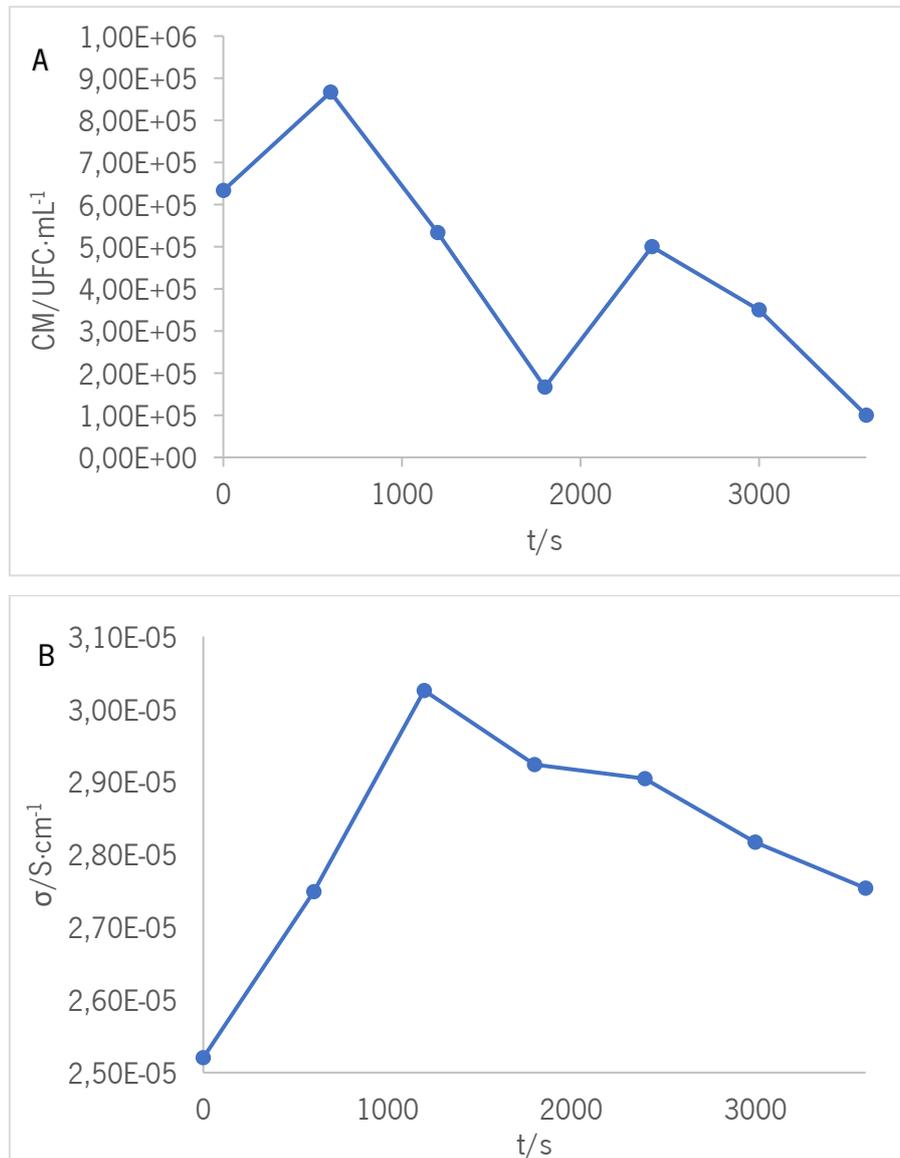


**Figura 4** Variação da condutividade elétrica (A) e temperatura (B) para amostras do inóculo de PYCC 4801 retiradas dos 0 min aos 60 min.

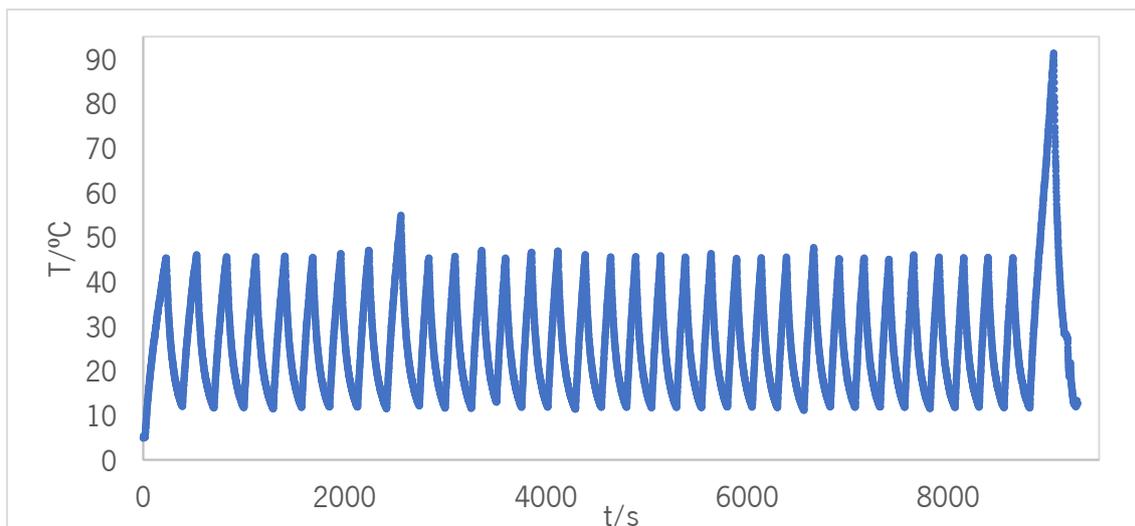
De modo a tentar um melhor entendimento dos resultados preliminares obtidos, fez-se uma tentativa de repetir o ensaio para eliminar possíveis erros experimentais. A variação da concentração celular e condutividade elétrica ao longo do tempo encontram-se representadas na Figura 5.

Através dos gráficos da Figura 5 é possível ver a mesma tendência para a condutividade elétrica comparativamente ao ensaio anterior, sendo que neste ensaio o máximo de condutividade foi atingido aos 20 min, seguido de um novo declínio, como no caso anterior. Já a concentração celular sofreu um decréscimo significativo aos 1800 s de processamento, verificando-se igualmente um aumento da concentração celular nos tempos de tratamento seguintes. Ainda, com

60 min de tratamento, foi verificada uma redução de cerca de 80 % da concentração inicial do inóculo. Concluiu-se então que apesar de alguns resultados promissores e redução inicial da concentração celular, os tempos de longos de tratamento e ciclos de refrigeração podem ter afetado a estabilidade da levedura durante o tratamento e assim a reprodutibilidade dos resultados.



**Figura 5** Variação da concentração célula (A) e condutividade elétrica (B) para amostras do inóculo de PYCC 4801 retiradas dos 0 min aos 60 min de tratamento.



**Figura 6** Variação da temperatura para amostras do inóculo de PYCC 4801 retiradas dos 0 min aos 60 min de tratamento.

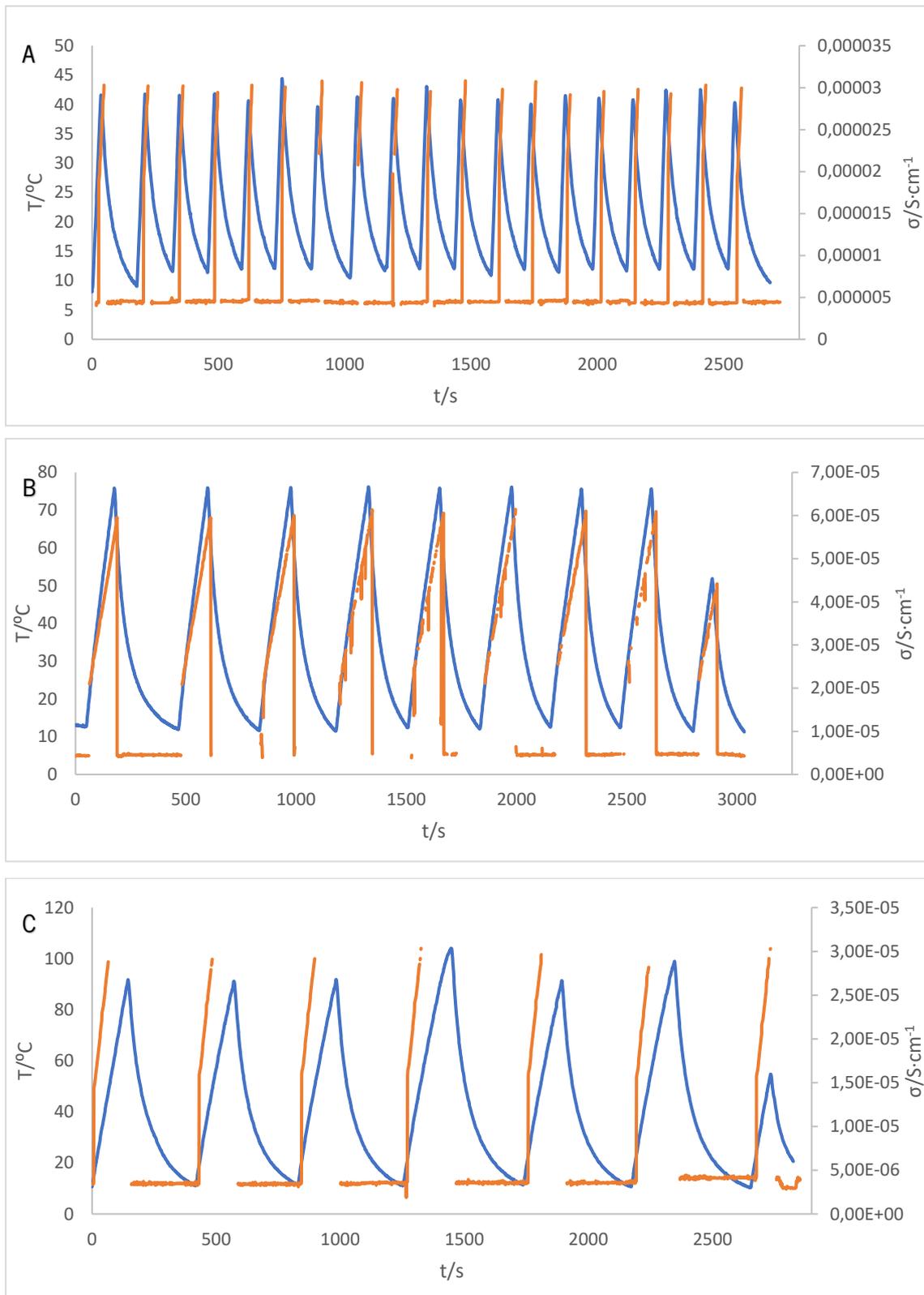
#### **4.2. Avaliação Preliminar em Levedura Isolada – Protocolo II**

Um segundo protocolo de tratamentos de inativação da levedura surgiu com o objetivo de reduzir o tempo de processamento e avaliar potenciais efeitos elétricos. Os resultados dum primeiro ensaio encontram-se descritos no Anexo II, uma vez que a condutividade inicial do inóculo revelou ser demasiado baixa ( $< 2 \mu\text{S}/\text{cm}$ ), fazendo com que a intensidade da corrente que atravessava o inóculo fosse residual.

Após esse primeiro ensaio, foi então novamente testado o segundo protocolo proposto, sendo que desta vez foi fixada a voltagem mais alta de 600 V, numa tentativa de criar efeitos de inativação na levedura, fazendo variar a temperatura de tratamento entre 40 °C, 75 °C e 90 °C.

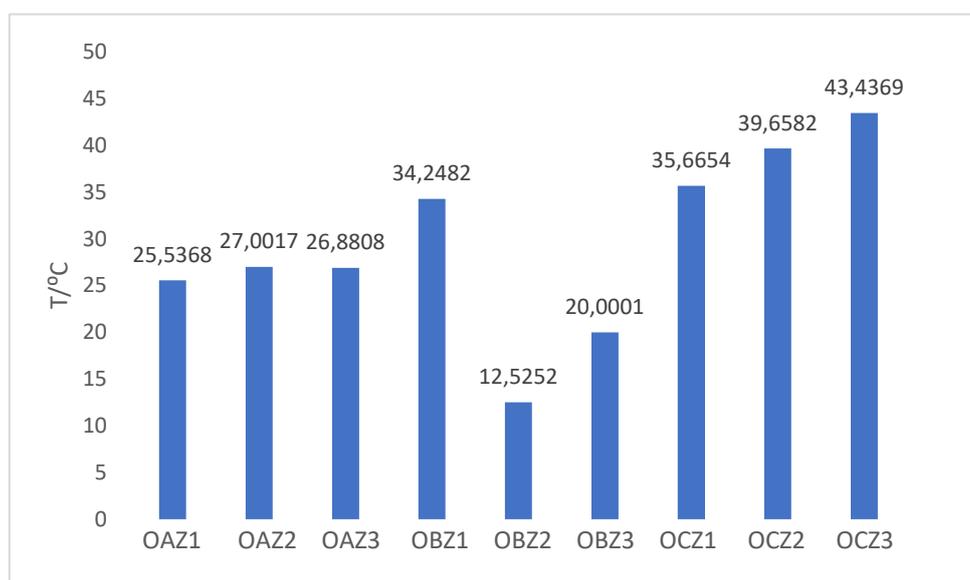
Como se pode ver, através das figuras 7, 8 e 9 os ensaios foram bastante influenciados pela condutividade inicial do inóculo. Por um outro lado, foi necessário diluir alguns dos inóculos correspondentes aos tratamentos a 40 °C e 75 °C através da adição de água ultrapura, uma vez que a sua condutividade inicial era bastante alta e dificultava o controlo da temperatura.

Através da análise da concentração celular dos inóculos, pode-se observar que, de uma forma geral, todos os tratamentos promoveram a inativação da levedura independentemente da temperatura utilizada, exceto nos casos em que a condutividade era demasiado baixa, o que não



**Figura 7** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) das amostras submetidas a ensaios com tempo de tratamento de 20 min, a um campo elétrico de 600 V/cm e temperatura de tratamento de 40 °C (A), 75 °C (B) e 90 °C (C).

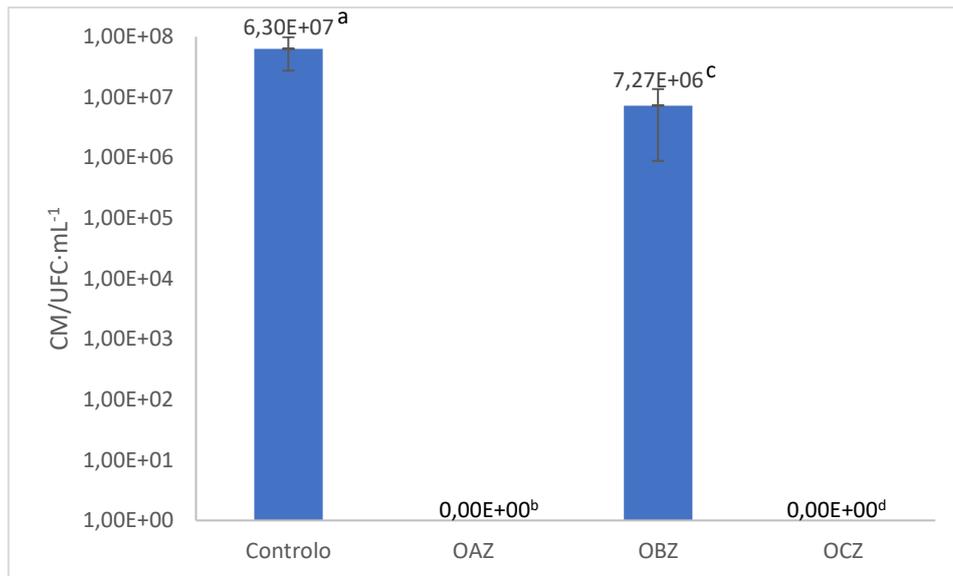
permitiu a passagem de corrente elétrica e aumento da temperatura – que é o caso de OBZ2 e OBZ3 (ver Figuras 43 e 44 presentes no Anexo II). Estes resultados evidenciam os efeitos elétricos da tecnologia na inativação deste tipo de leveduras, sendo que campos elétricos de 600 V/cm com temperaturas máximas de 40 °C serão suficientes para reduzir a carga microbiológica inicial. Neste caso foi possível reduzir cerca de 7 log. Nos restantes ensaios, devido à baixa condutividade de alguns inóculos, não foi possível a aplicação efetiva do campo elétrico, o que determinou algum crescimento confirmado em placa (Figuras 9 e 10). É ainda de salientar que se verificou a ocorrência de algum crescimento celular nas amostras tratadas a 90 °C e 600 V/cm quando se apenas se atingiram os 10 dias de crescimento em placa, para valores de  $2,77 \cdot 10^6$  UFC/mL. Tal acontecimento pode ser indicativo de que os tratamentos de alguma forma afetam o desenvolvimento destas leveduras.



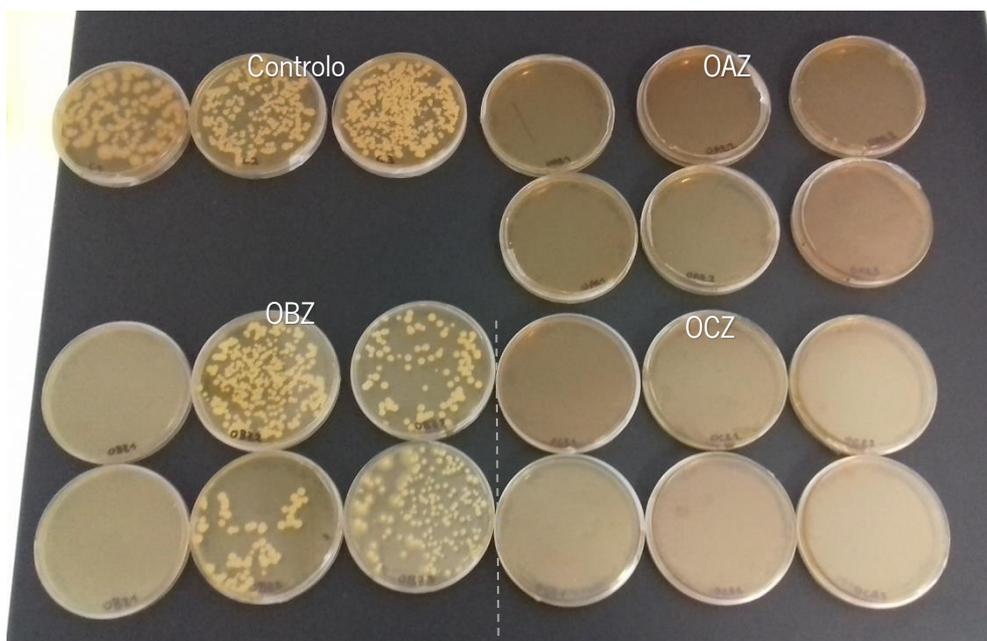
**Figura 8** Temperatura média das amostras submetidas a tratamento ôhmico (os números que se seguem à identificação das letras referem-se aos triplicados).

De maneira a aferir definitivamente o papel do campo elétrico na inativação celular da levedura e concluir qual o papel da componente elétrica e da componente térmica, foram testados inóculos de levedura – preparados como anteriormente – sendo três deles submetidos a um tratamento só usando temperatura (40 °C, por 20 min) enquanto que outros três inóculos eram submetidos a tratamento com campo elétrico de 600 V/cm.

Nos tratamentos em que foi conseguida a passagem de corrente elétrica e a subida de temperatura até à temperatura pretendida foi possível verificar a inativação total dos microrganismos neles presentes; no entanto, a condutividade elétrica de alguns stocks de levedura



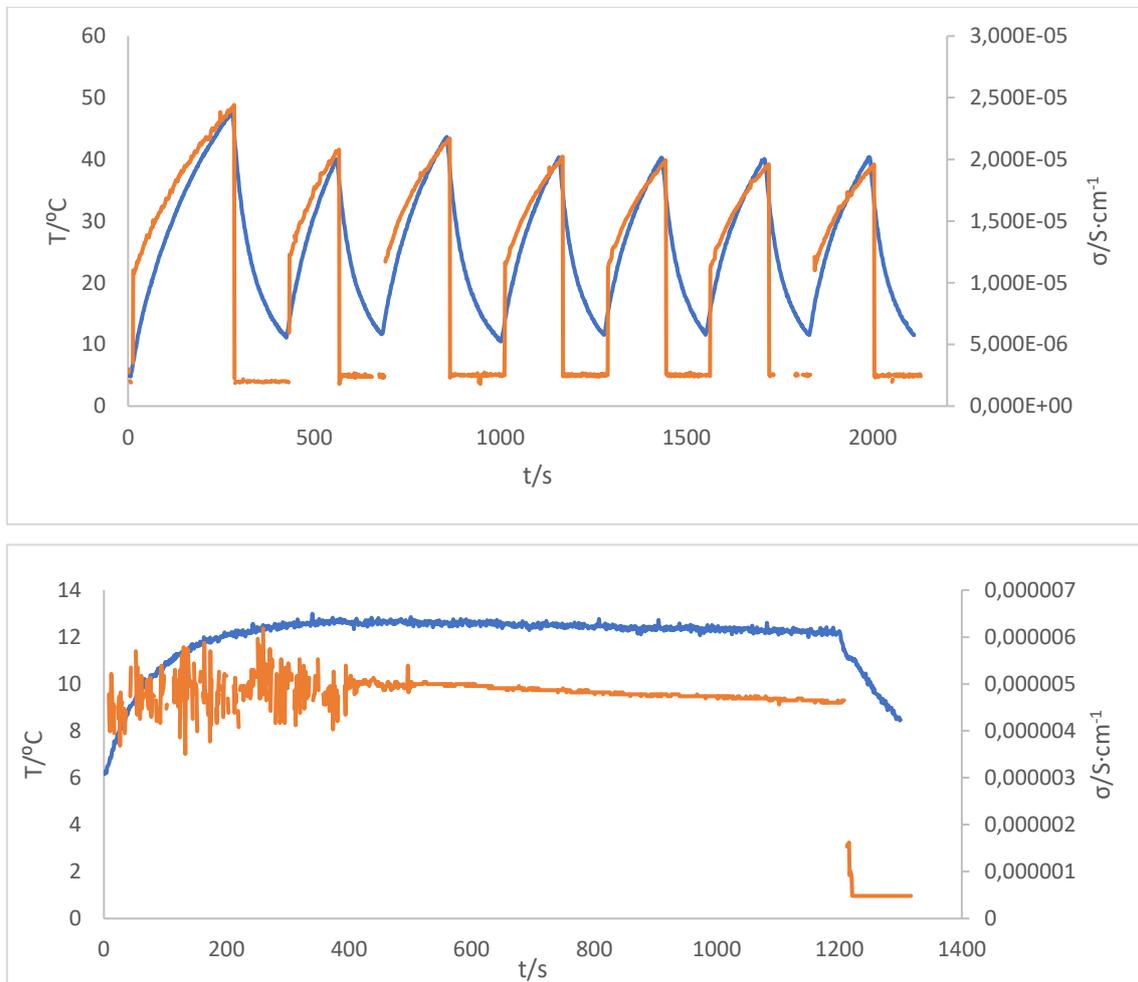
**Figura 9** Concentração celular em média no final de cada ensaio de tratamento óhmico. Os caracteres a, b, c e d representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos.



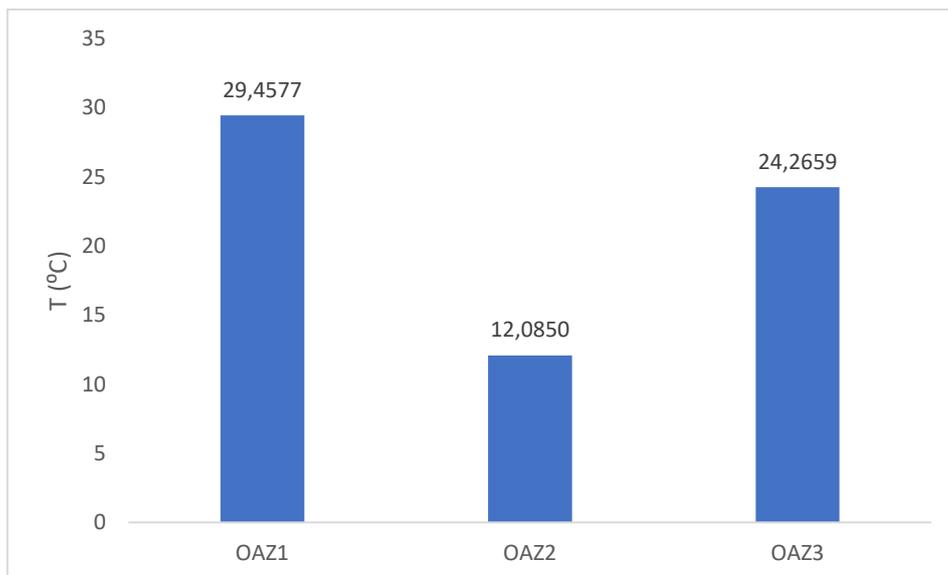
**Figura 10** Imagem captada após um período de cinco dias de crescimento em placa das amostras de controlo e das amostras submetidas a tratamento óhmico.

impossibilitou a passagem de corrente elétrica e, conseqüentemente, efeitos de inativação – pelo que a temperatura média de tratamento, por esse motivo, foi igualmente baixa, justificando algum crescimento celular (ver Figuras 13 e 14). Neste conjunto de ensaios verificaram-se contaminações de outras espécies microbianas, sendo que as UFC's de *D. bruxellensis* se apresentavam de maiores dimensões em relação a outras espécies microbianas contaminantes. Esta contaminação não ocorreu durante os ensaios uma vez que algumas placas do controlo já continham as mesmas

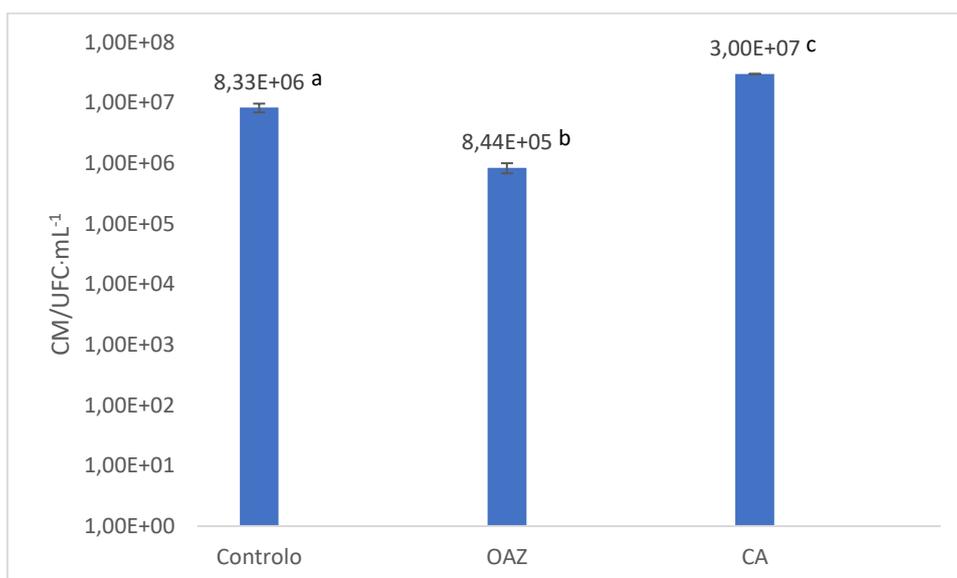
espécies. É ainda de salientar que para os tratamentos térmicos à temperatura constante de 40 °C sem presença de campo elétrico, verificou-se um crescimento de espécies microbianas mais acentuado do que nos controlos ou nos tratamentos com presença de campo elétrico e nas gamas de operação utilizadas (aproximadamente 40 °C).



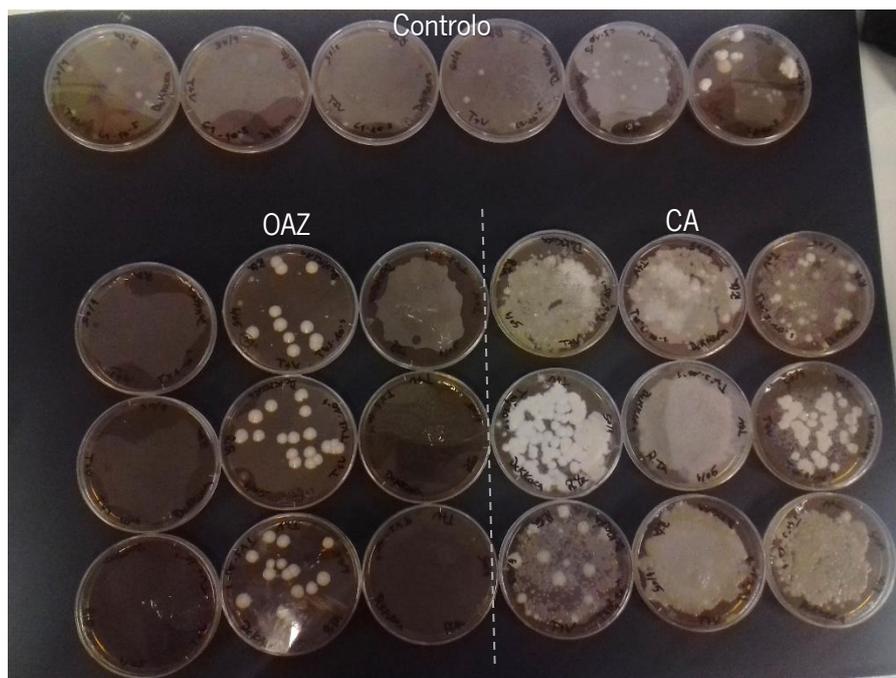
**Figura 11** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) de duas das amostras submetidas a ensaios com tempo de tratamento de 20 min, a um campo elétrico de 600 V/cm e temperatura de tratamento de 40 °C.



**Figura 12** Temperatura média das amostras submetidas a tratamento óhmico (os números que se seguem à identificação das letras referem-se aos triplicados).



**Figura 13** Concentração celular em média no final de cada ensaio de tratamento óhmico. Os caracteres a, b e c representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos.



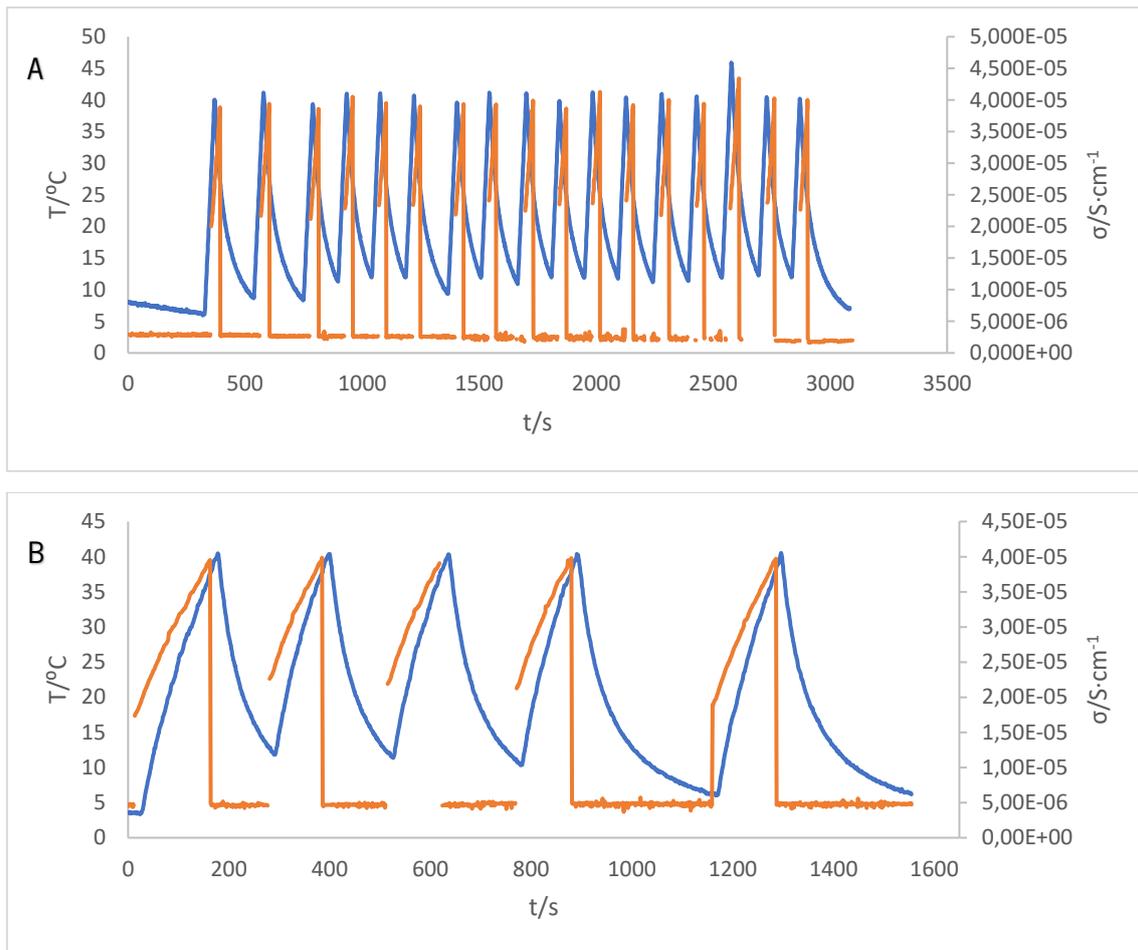
**Figura 14** Imagem captada após um período de cinco dias de crescimento em placa.

### **4.3. Avaliação Preliminar Em Levedura Isolada – Protocolo III**

Numa tentativa de solucionar o problema da baixa condutividade elétrica após a preparação do inóculo, resultando em baixos níveis de efeito elétrico na amostra e, conseqüentemente, na pouca eficácia de inativação dessas mesmas amostras, foi realizado o terceiro protocolo – em que houve a adição de um passo de adição de 20  $\mu\text{L}$  de solução PBS a 9,98 mL de inóculo lavado. Foi feito um ensaio inicial, exposto no Anexo II, onde estas mesmas condições foram aplicadas, no entanto a diluição utilizada revelou ser demasiado alta – onde as colónias de levedura formadas não se encontravam num intervalo entre 30 e 300 colónias.

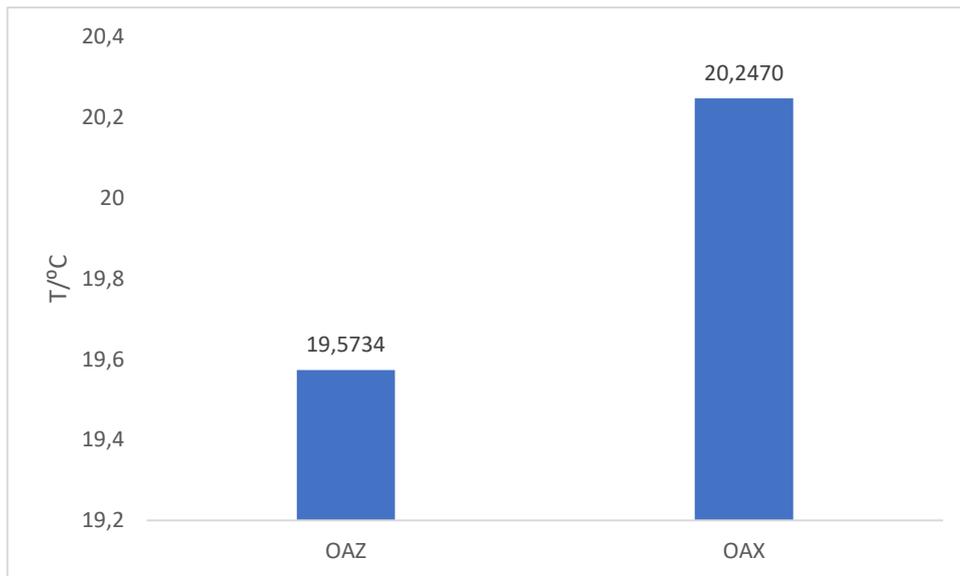
Deste modo, foi realizada uma repetição desse mesmo ensaio para tentar convergir os resultados e conclusões. Foi criado um inóculo com as mesmas quantidades de água, stock de levedura e solução PBS, no entanto a respetiva condutividade inicial revelou ser, para este caso, 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Neste conjunto de ensaios a reprodutibilidade não foi elevada. Em geral, o decréscimo celular não foi tão acentuado (inferior a 1 ciclo logarítmico) ao contrário do observado anteriormente, em particular para o campo elétrico mais elevado de 600 V/cm. Estas diferenças observadas no padrão de comportamento podem-se justificar por pequenas oscilações nos valores de condutividade elétrica; uma maior condutividade elétrica determina um aumento de

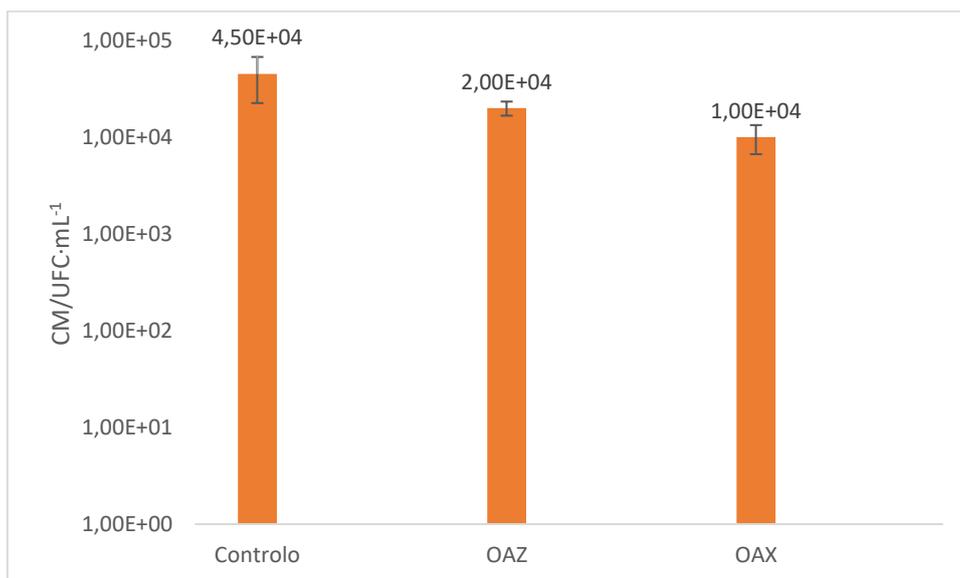


**Figura 15** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para o ensaio a 600 V/cm (A) e 400 V/cm (B), ambos a 40 °C durante um intervalo de 20 min.

temperatura mais rápido sobretudo para o valor de campo elétrico de 600 V/cm e consequentemente uma menor exposição a este por ciclo de tratamento. Outro facto que pode ter contribuído para as oscilações nos resultados pode-se dever à ausência de nutrientes no meio de suspensão de leveduras lavadas, o que pode provocar algum stress metabólico levando à lise celular espontânea, independentemente do tipo de tratamento aplicado, afetando dessa forma a reprodutibilidade dos ensaios realizados. Apesar de se verificar a tendência geral de diminuição de crescimento celular com aplicação de campo elétrico a temperaturas sub-letais (<40 °C), tornou-se importante avaliar a influencia do tratamento nas leveduras no seu meio de crescimento.



**Figura 16** Temperaturas médias de tratamento aquando testado o aquecimento óhmico (os número que se seguem à identificação das letras referem-se aos triplicados).



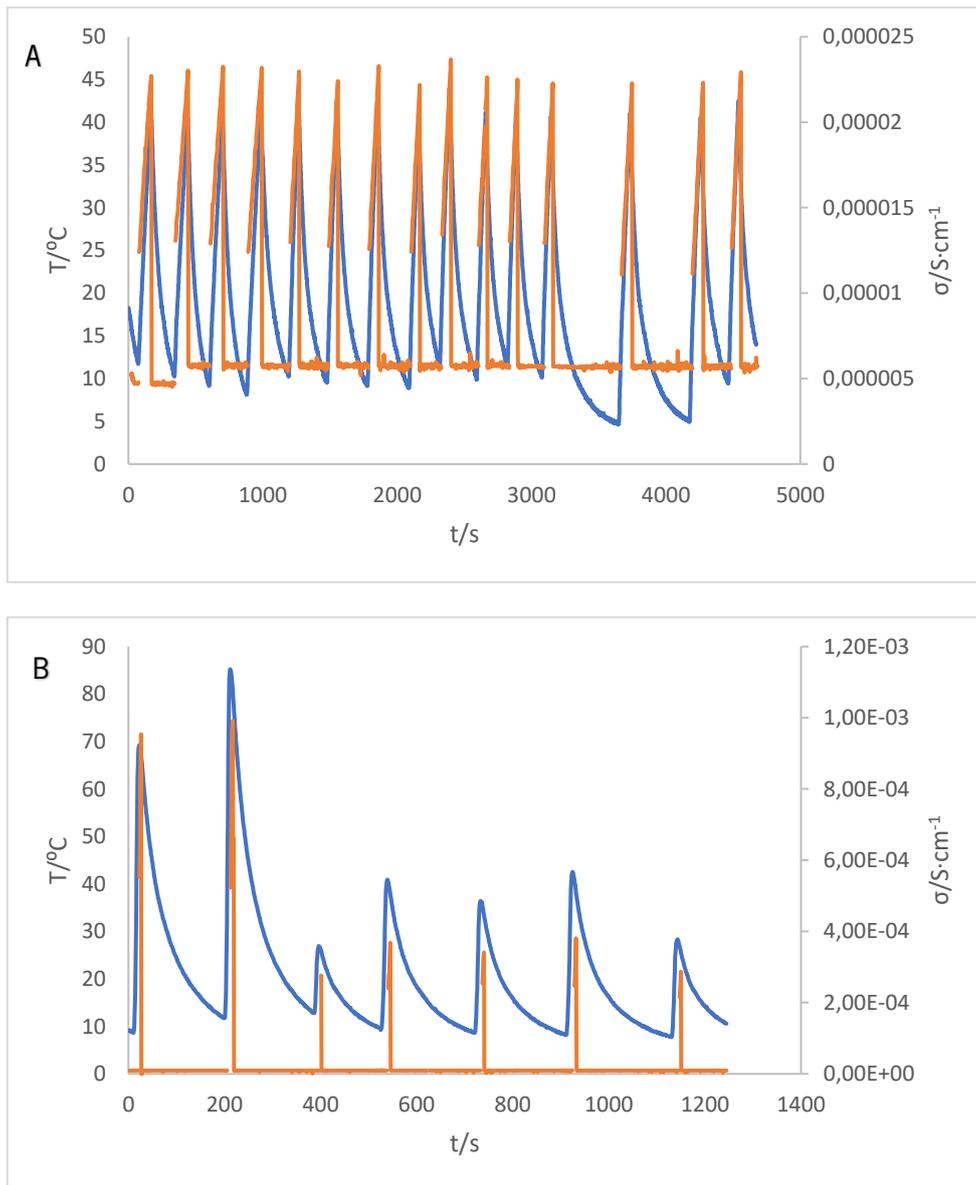
**Figura 17** Concentração celular dos inóculos de controlo e os inóculos submetidos a aquecimento óhmico.

#### **4.4. Avaliação Preliminar em Levedura Isolada – Protocolo IV**

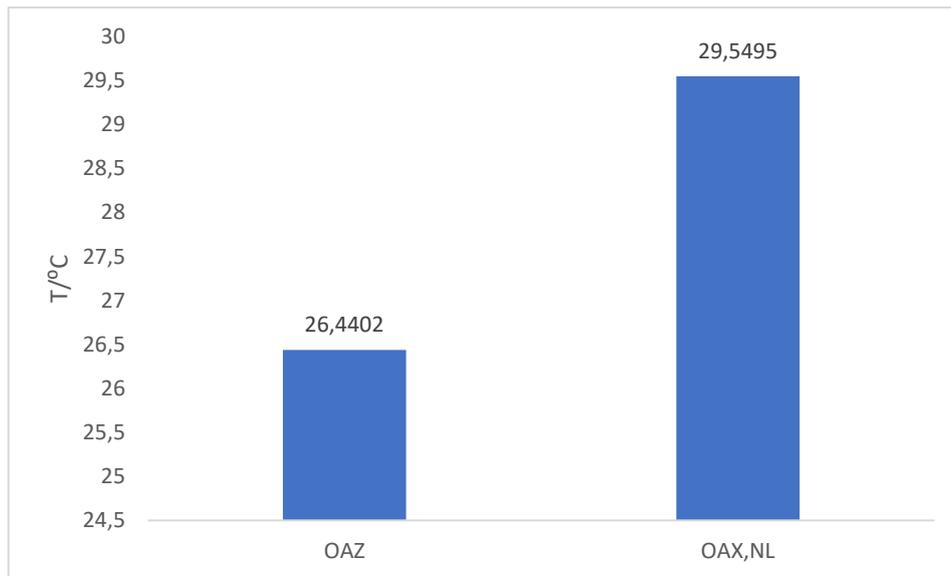
Numa tentativa de averiguar as condições e resultados de um ensaio em que não se empregavam lavagens do inóculo de levedura anterior ao início do ensaio, foi testado um inóculo de levedura lavado como anteriormente e um inóculo de levedura sem essas mesmas lavagens. Para o inóculo lavado foi testada a voltagem de 600 V/cm, enquanto que para o inóculo não lavado, numa tentativa de melhorar o controlo da temperatura, foi testada a voltagem de 400 V/cm.

Na comparação das Figuras 18.A e 18.B, são visíveis as maiores dificuldades em manter a temperatura máxima de tratamento abaixo dos 40 °C no caso do inóculo não-lavado. Analisando estes novos gráficos, é visível um aumento da intensidade da corrente nos valores em que a temperatura também foi maior. Nesses ensaios o mecanismo de inativação deveu-se a uma sinergia entre campo elétrico e temperatura – principalmente nos casos cuja temperatura máxima do meio se situou entre os 80 °C e 90 °C nos seus ciclos de subida de temperatura.

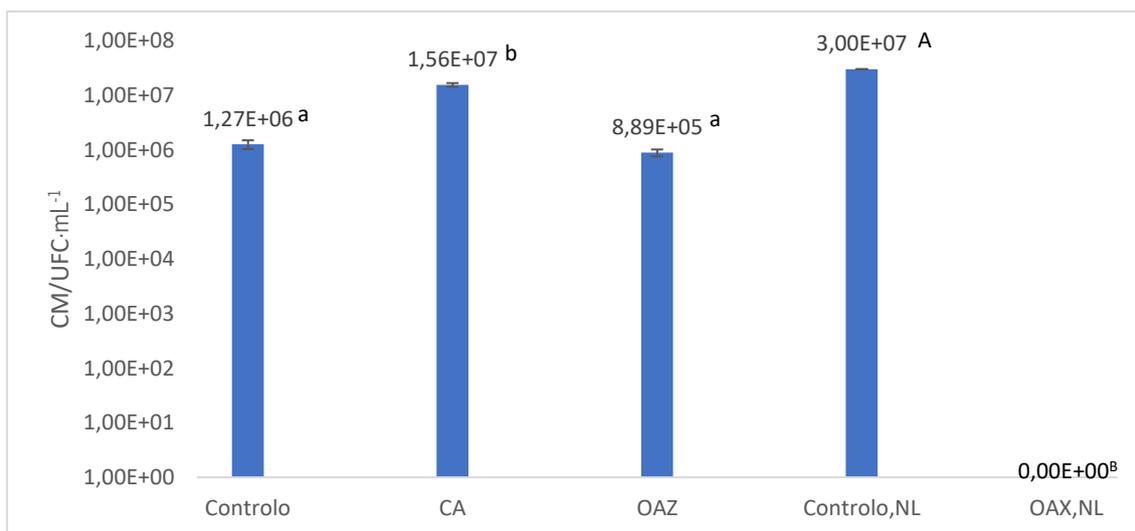
No que toca à concentração celular, primeiramente verifica-se que o controlo para o inóculo não-lavado apresenta uma concentração celular superior ao controlo do inóculo lavado, o que pode aferir que com as lavagens se potencia uma diminuição significativa de concentração celular. Verifica-se também que, para o inóculo tratado pelo método convencional, houve até um aumento da concentração celular em relação ao seu controlo; em sentido contrário o tratamento em que foi aplicado campo elétrico determinou uma menor concentração de células. O tratamento mais eficaz neste ensaio foi aquele em que foi aplicado um campo elétrico de 400 V/cm a um inóculo em que não se recorreram a lavagens prévias, tendo havido uma redução de 7 log de concentração de células. É de referir que o campo elétrico terá sido um dos fatores de inativação da levedura, uma vez que o ensaio a uma temperatura constante de 40 °C (tratamento convencional) determinou uma menor inativação como ilustra a Figura 20 e 21 – tal facto é ainda visível aquando a comparação das percentagens de células mortas, expostas na Figura 50 do Anexo II.



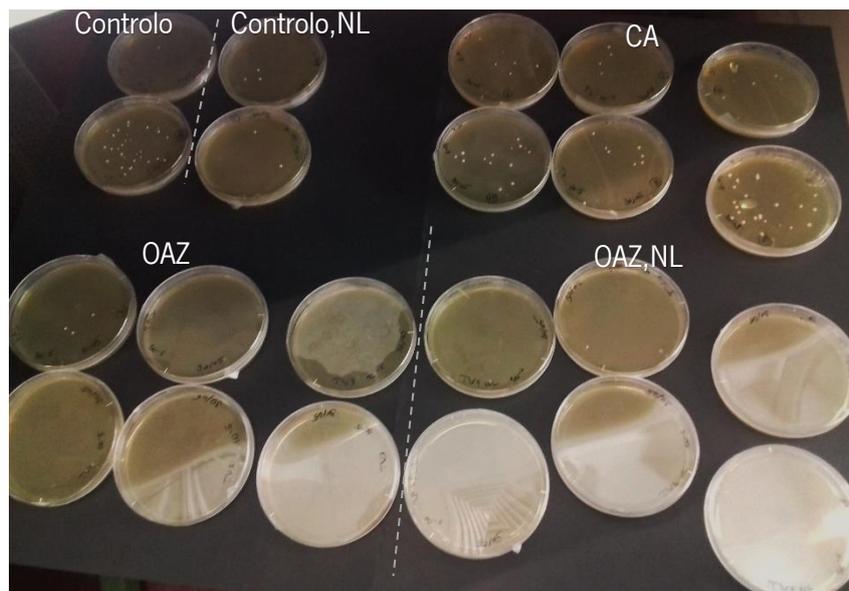
**Figura 18** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para dois dos ensaios a 600 V/cm e uma temperatura máxima de 40 °C, por um tempo de tratamento de 20 min, utilizando o inóculo lavado (A) e inóculo não-lavado (B).



**Figura 19** Temperaturas médias de tratamento aquando testado o aquecimento óhmico, incluindo os inóculos tratados sem lavagem prévia do meio (NL).



**Figura 20** Concentração celular dos inóculos de controlo lavado e não-lavado (NL), para os inóculos que sofreram apenas tratamento por aumento da temperatura e para os inóculos submetidos a aquecimento óhmico lavados e não-lavados. Os caracteres a, b, A e B representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos.



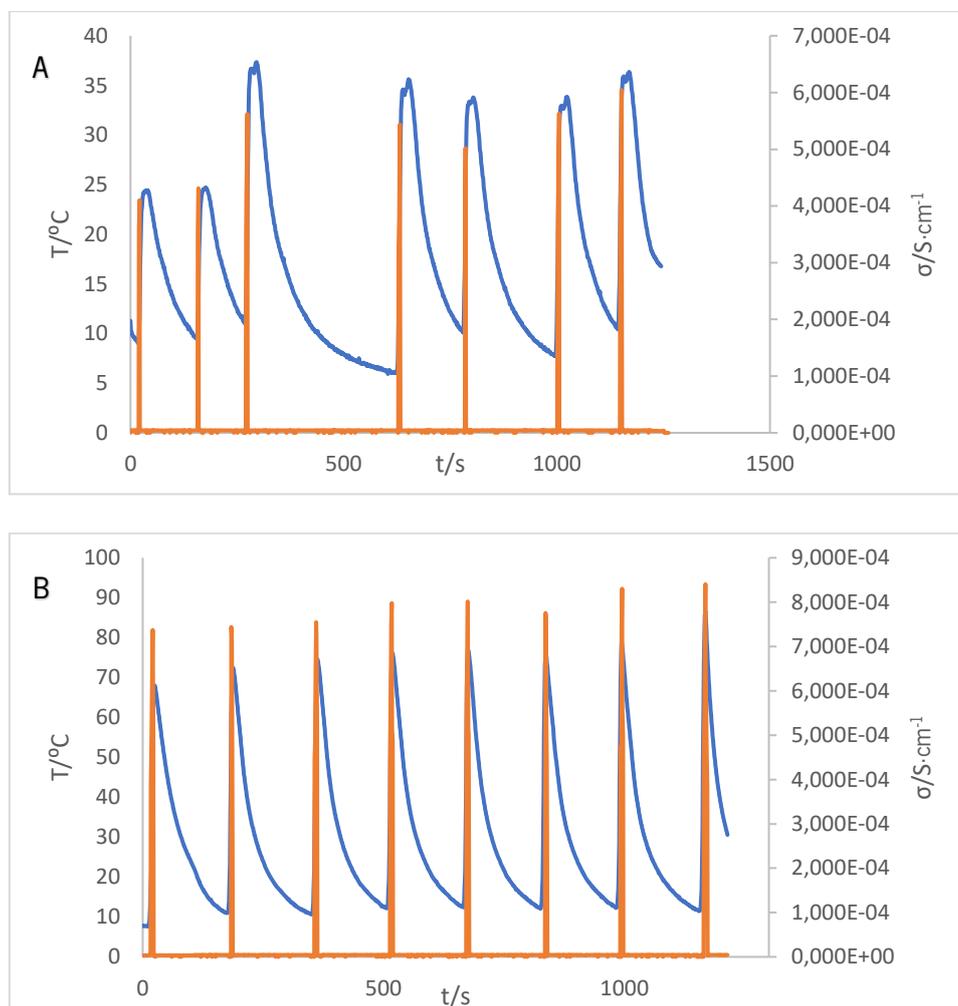
**Figura 21** Imagem captada após um período de cinco dias de crescimento em placa.

De maneira a aferir acerca do efeito de inativação do tratamento óhmico, e consequentemente o papel do campo elétrico, empregando uma voltagem inferior e uma voltagem superior aquando comparado com o método tradicional de inativação, foi executado o protocolo em que foram testadas três temperaturas diferentes – 40° C, 75° C e 90° C – com campo elétrico de 400 V/cm e 90 V/cm, com a adição de um tratamento sem a aplicação de campo elétrico (tratamento térmico).

Analisando as Figuras 24 e 25 é possível verificar que o tratamento de maior temperatura, quer na presença de campo elétrico, quer na ausência de campo elétrico, determinou a inativação total das células do inóculo – devido presumivelmente a efeitos térmicos. Nesse sentido, o aquecimento óhmico poderá ser uma alternativa interessante no processo de pasteurização de Vinho Verde, tendo em conta a sua rapidez de processo e menor degradação térmica da qualidade associada.

Já para os tratamentos a uma temperatura inferior (40 °C), obteve-se o mesmo nível de inativação apenas quando o campo elétrico foi maior (400 V/cm), sendo que nos restantes casos a concentração celular sofreu um aumento em relação ao controlo. Deste modo, é possível confirmar que campos elétricos de 400 V/cm com temperaturas máximas de 40 °C em tratamentos de 20 min serão suficientes para promover a inativação da levedura-alvo. Neste caso a inativação foi de pelo menos 6 log, o que permite provar o conceito de inativação não-térmica e fornecer uma boa margem de segurança do processo.

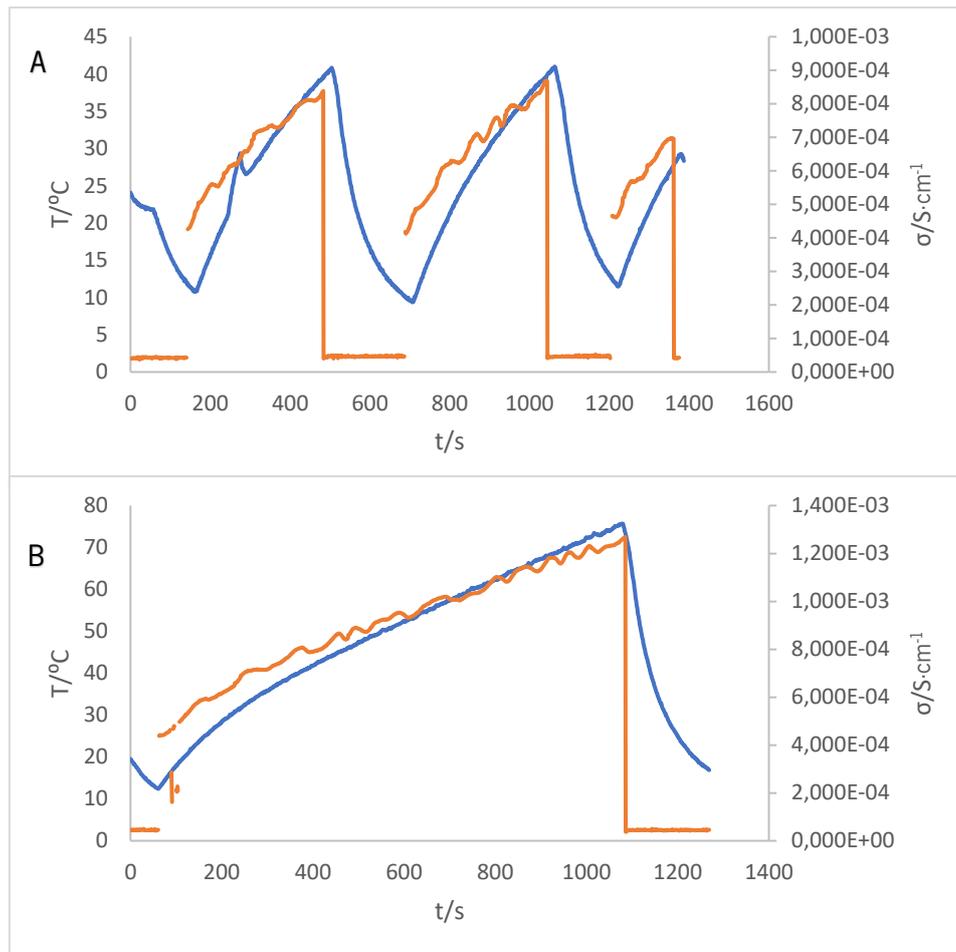
Contagens realizadas em câmara de Neubauer puderam aferir acerca da morfologia e quantidade de células vivas e mortas. Os dados resultantes dessas contagens encontram-se presentes no Anexo II.



**Figura 22** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para alguns dos ensaios de tratamento do inóculo de levedura não-lavado a 400 V/cm, temperatura máxima de 40 °C (A) e 75 °C (B), durante um intervalo de tempo de 20 min.

Numa tentativa de convergir os resultados obtidos e de se fazer um estudo de prateleira de maneira a estudar a durabilidade do efeito de inativação, realizou-se um novo ensaio utilizando o protocolo anterior. Os dados acerca da variação da temperatura e condutividade elétrica para este ensaio encontram-se expostos no Anexo II.

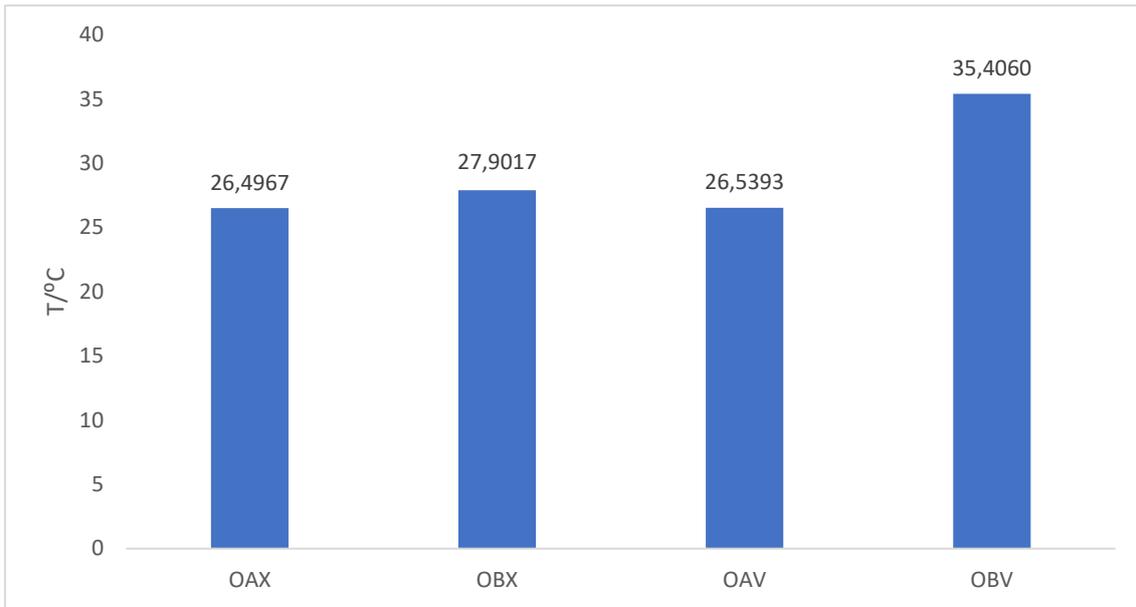
Analisando o gráfico da Figura 28, pode-se confirmar os mesmos resultados iniciais após os tratamentos de inativação, ou seja, que as temperaturas de tratamento de 75 °C inativam eficazmente a levedura – possivelmente devido a efeitos térmicos – e que há apenas crescimento celular nos tratamentos a 40 °C quando se teve ausência de campos elétricos ou quando os



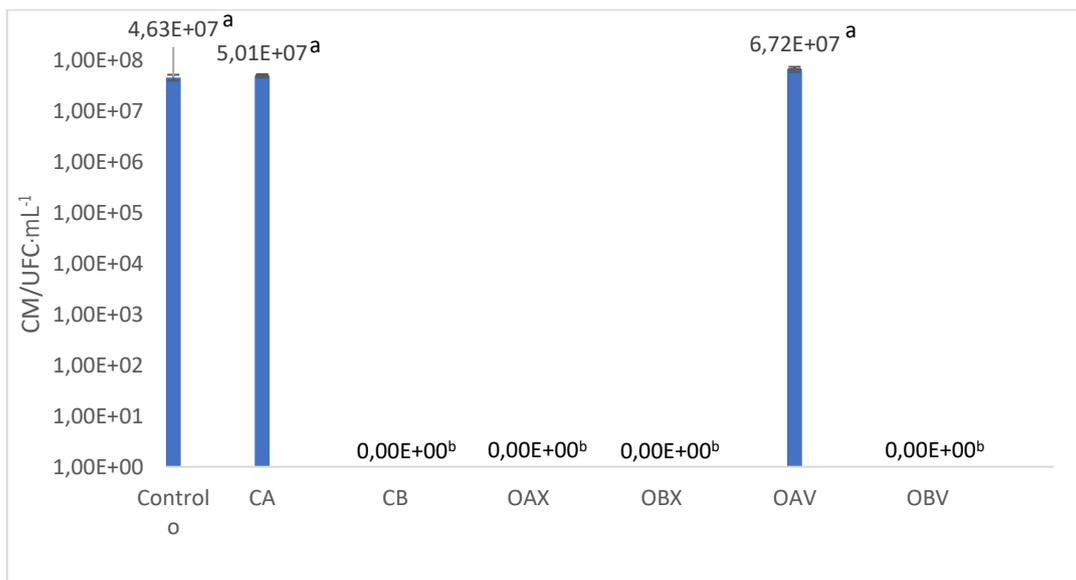
**Figura 23** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para alguns dos ensaios de tratamento de inóculo de levedura não-lavado a 45 V/cm, temperatura máxima de 40 °C (A) e 75 °C (B), durante um intervalo de tempo de 20 min.

campos elétricos foram menores (90 V/cm), sendo que, para a temperatura de 40 °C e campo elétrico de 400 V/cm não houve crescimento celular logo após o tratamento. Estes resultados demonstram que a intensidade de campo elétrico é um fator importante na inativação celular.

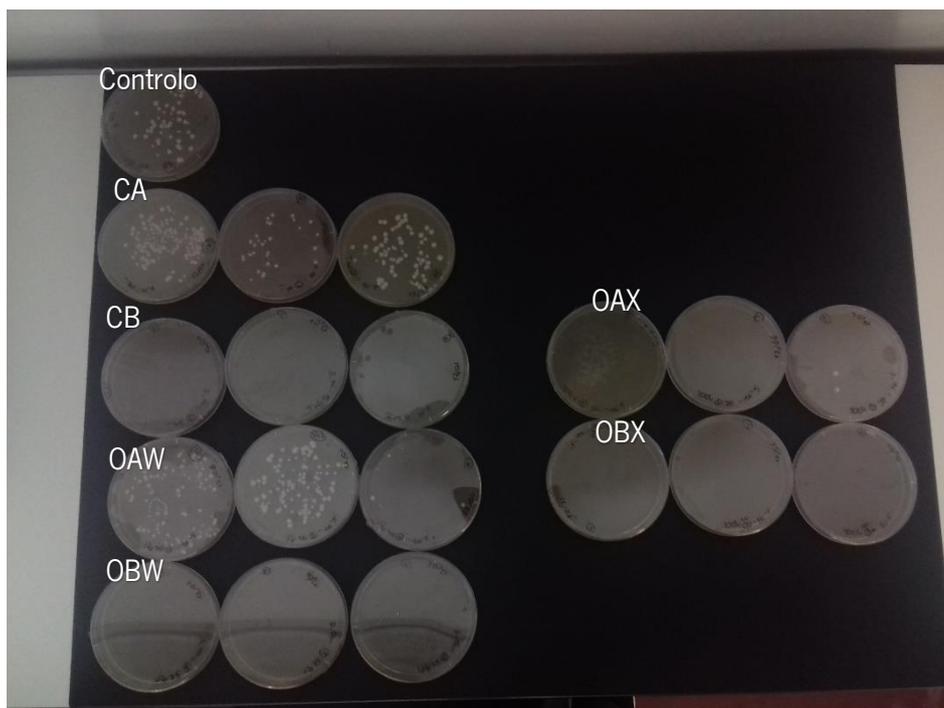
Durante o tempo de armazenamento verificou-se uma redução da concentração celular do controlo em relação a  $t = 0$  h, o que pode indicar que as células de levedura não estariam a sobreviver nas condições a que foram colocadas, sobretudo devido à ausência de nutrientes no meio. É de registar que nas amostras mais promissoras que foram submetidas a tratamento elétrico (como a OAX e OBX) não se verificaram grandes alterações no padrão de crescimento ao longo do estudo de tempo de prateleira relativamente às restantes.



**Figura 24** Temperaturas médias de tratamento aquando testado o aquecimento óhmico; os números que se seguem à identificação das letras referem-se a cada uma das réplicas.

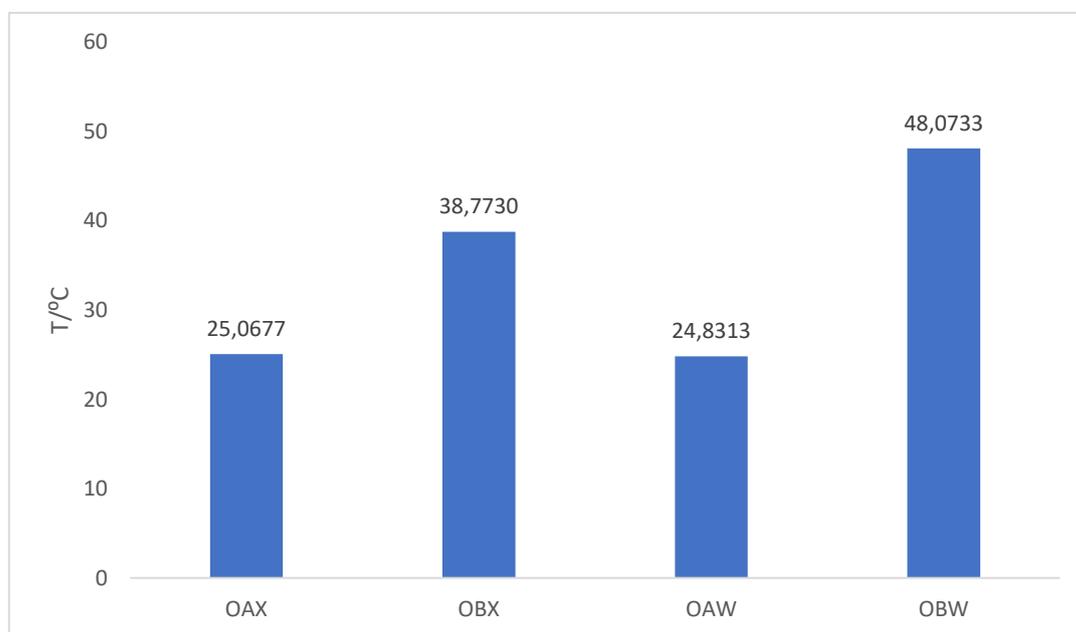


**Figura 25** Concentração celular dos inóculos de controlo, para os inóculos que sofreram apenas tratamento por aumento da temperatura e para os inóculos submetidos a aquecimento óhmico. Os caracteres a e b representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos.

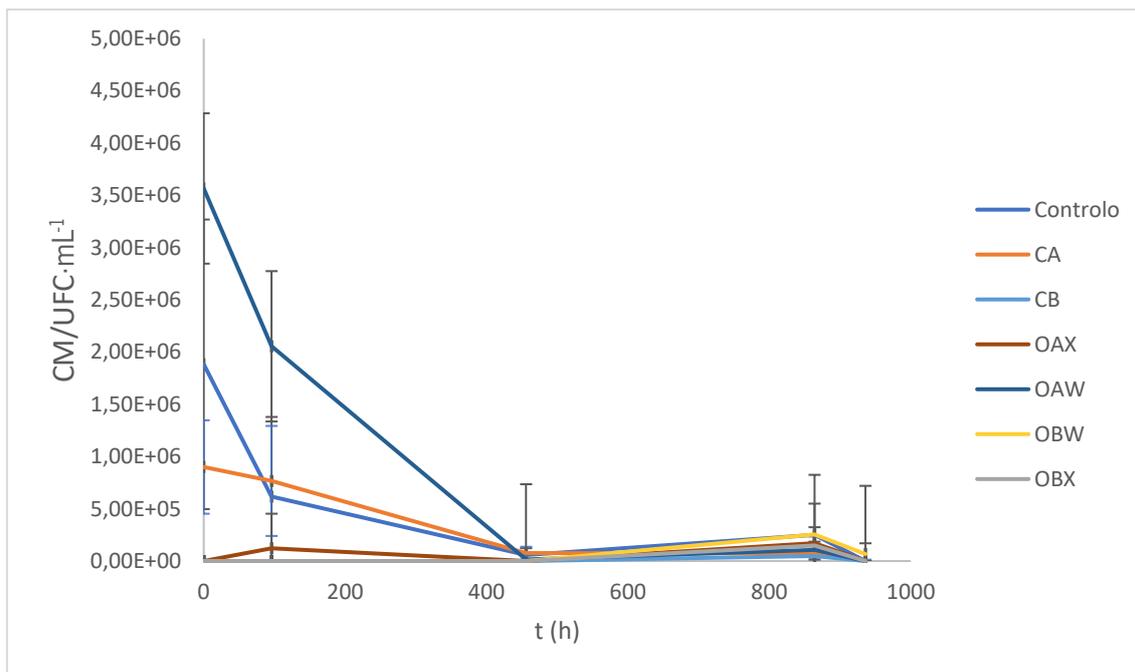


**Figura 26** Imagem captada após um período de sete dias de crescimento em placa.

Apenas se observa uma alteração de tendência no crescimento celular em  $t = 864$  h, onde houve crescimento celular em todas as placas – tendo este sido menor para o tratamento convencional – e para  $t = 936$  h, onde houve contaminação de várias placas.



**Figura 27** Temperaturas médias de tratamento aquando testado o aquecimento óhmico.



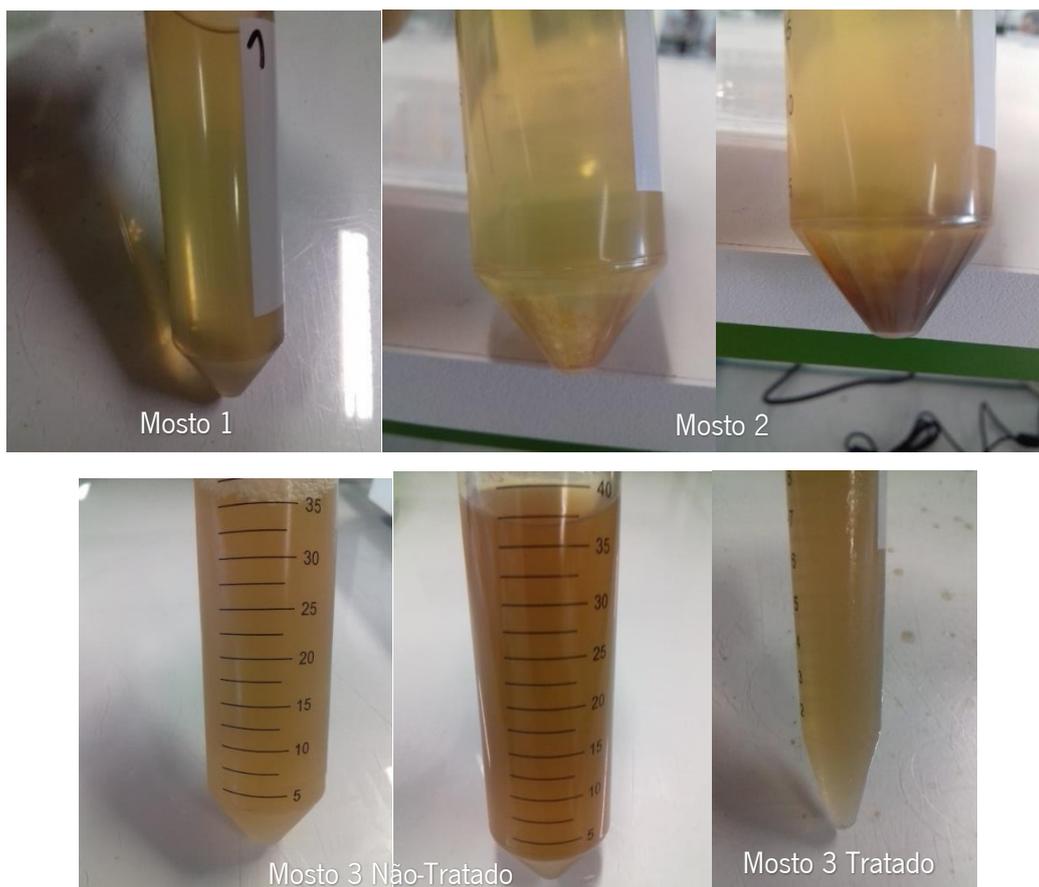
**Figura 28** Variação da concentração celular ao longo do tempo para todas as amostras testadas em tratamento óhmico e pelo método convencional, e ainda o controlo.

#### 4.5. Caracterização Físico-Química do Mosto de Vinho

Para a caracterização microbiológica do mosto do vinho com o objetivo de uma posterior fermentação, usou-se mosto de vinho da casta Fernão Pires – sendo que os mostos 1 e 2 foram amostras de mosto recolhidas de um lote de mosto de uvas feito em 2019 e o mosto 3 e 4 foram amostras de mosto recolhidas de um lote distinto de mosto de uvas também produzido em 2019.

No que se refere aos tratamentos óhmicos do mosto, os gráficos referentes à variação da condutividade elétrica e temperatura encontram-se expostos no Anexo II (Figuras 61 e 62). É de mencionar os seus menores valores de condutividade elétrica, causados pelo diferente distanciamento e dimensões dos elétrodos por necessidade de utilizar um reator de maiores dimensões onde fosse possível tratar um maior volume em cada ensaio. A maior distância dos elétrodos poderá ter gerado uma corrente elétrica menor a passar pelo meio, diminuindo o valor do campo elétrico em relação aos outros ensaios e possivelmente causando menor efeito de inativação.

Analisando a Figura 29, as amostras tiveram alguma variabilidade em termos de cor e quantidade de material depositado para os mostos não-tratados, no entanto, essa variabilidade não se verificou nas restantes análises físico-químicas. Apenas foram visíveis a olho nu a distinção



**Figura 29** Análise visual da variabilidade das amostras de mosto corresponde ao mosto 1, 2 e 3 tratados e não-tratados

entre amostras com mosto com maior depósito, obtendo estas tonalidades mais acastanhadas e escuras em relação ao outro caso. Já no mosto 2 e 3 tratado, foi visível uma alteração da cor de um amarelo claro para âmbar, sem a existência de depósitos de partículas sólidas – tendo estas possivelmente ressuspensão por efeitos do tratamento.

Nas tabelas 3 e 4 estão presentes os valores obtidos para os diferentes parâmetros físico-químicos estudados. Pode-se observar que não houve uma variabilidade acentuada nos valores dos parâmetros estudados para os mostos não-tratados pertencentes à mesma casta, com a exceção do teor proteico do mosto 1. Já o aquecimento óhmico também não teve nenhum efeito aparente nos parâmetros dos mostos – apenas para o teor proteico se verifica um aumento do valor para o mosto 2 e uma diminuição para o mosto 3. Uma vez que não houve reprodutibilidade na análise em relação ao teor proteico, não foi possível aferir se o tratamento óhmico tem influência sobre o mosto nesse parâmetro. Por fim, a concentração de açúcares redutores encontra-se exposta no Anexo II.



**Figura 30** Aspeto visual do mosto 2 tratado (à direita) e não-tratado (à esquerda) logo após o tratamento óhmico.

**Tabela 3.** Teor proteico dos vários mostos testados quantificado pelo método Coomassie – os caracteres a, b, c e d representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos

	<b>Teor Proteico (mg/L)</b>
<b>Mosto 1</b>	15,6343 <sup>a</sup> ± 0,7135
<b>Mosto 2</b>	9,9547 <sup>b</sup> ± 1,3973
<b>Mosto 2 OH</b>	14,9005 <sup>a</sup> ± 0,2736
<b>Mosto 3</b>	9,2119 <sup>c</sup> ± 0,5334
<b>Mosto 3 OH</b>	6,1501 <sup>d</sup> ± 0,3805

**Tabela 4.** Valores de pH, Acidez total expressa em gramas de ácido tartárico e concentração de sólidos solúveis totais para os vários mostos – os caracteres a, b e c representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos

	<b>AT (g/L)</b>	<b>pH</b>	<b>SST (°Brix)</b>
<b>Mosto 1</b>	4,9250 <sup>a</sup> ± 0,1561	2,9833 <sup>a</sup> ± 0,0404	17,0000 <sup>a</sup> ± 0,3464
<b>Mosto 2</b>	4,5250 <sup>a</sup> ± 0,1561	3,0000 <sup>a</sup> ± 0,0700	18,2333 <sup>b</sup> ± 0,0577
<b>Mosto 2 OH</b>	5,6250 <sup>b</sup> ± 0,3000	2,9933 <sup>a</sup> ± 0,0152	18,1333 <sup>b</sup> ± 0,1528
<b>Mosto 3</b>	6,3750 <sup>c</sup> ± 0,1984	3,0900 <sup>a</sup> ± 0,0100	17,5667 <sup>c</sup> ± 0,0577
<b>Mosto 3 OH</b>	7,0000 <sup>c</sup> ± 0,3382	2,9400 <sup>b</sup> ± 0,0265	17,1000 <sup>c</sup> ± 0,1000

#### **4.6. Caracterização Microbiológica do Mosto de Vinho e Estudo do Tempo de Prateleira**

No que diz respeito à caracterização microbiológica dos mostos, utilizou-se o meio WL não-seletivo e os conhecimentos acerca da morfologia e tempo de crescimento para identificar os possíveis microrganismos presentes nos mostos. Consideraram-se as morfologias das espécies descritas na Tabela 5.

Na caracterização do mosto 1 foi possível observar a existência de colónias de *P. membranifaciens*, bem como de uma outra espécie de fungo filamentosos e ainda a presença de *H. uvarum*. Já após o tratamento, não houve crescimento de microrganismos em placa até a concentração de  $10^4$ .

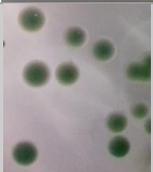
Com o estudo do tempo de prateleira, que decorreu à temperatura ambiente, verificou-se a presença de uma maior variedade de espécies, sendo a *H. uvarum* a espécie dominante, tanto para o mosto tratado como para o mosto não-tratado. Verificou-se também a presença espécies de fungos filamentosos, sendo que com a aplicação do tratamento, estas espécies poderão ter tido maior oportunidade de crescimento – possivelmente devido a uma maior resistência a este, acoplada a uma menor competição do meio – onde houve também o crescimento de *S. pombe* e de bactérias ácido acéticas – caracterizadas pela sua cor verde escura intensa e formato punctiforme de reduzidas dimensões.

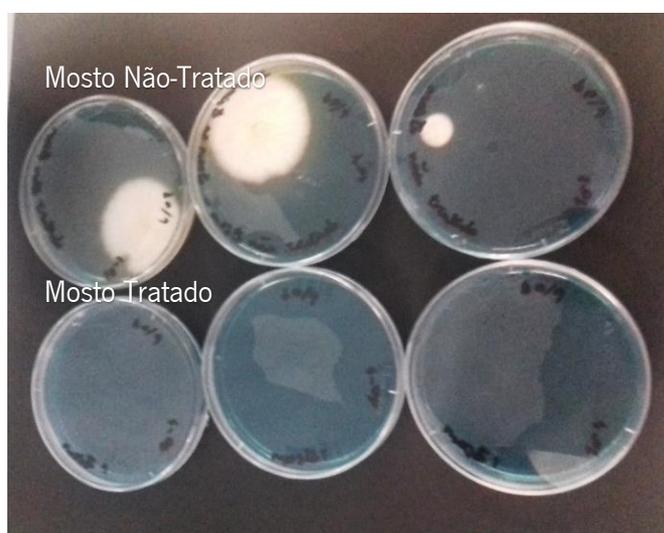
No caso das bactérias, o meio usado não é considerado indicado para a sua contagem, portanto a sua concentração exata não poderá ser deduzida por este método, apenas podendo confirmar a sua presença.

O tratamento por OH, mesmo após 11 dias, terá reduzido a presença de *H. uvarum* na ordem dos 98,5 %, havendo ainda uma inativação de 87 % uma espécie desconhecida com a coloração verde escura intensa e morfologia redonda e uma inativação eficiente de *P. anomala* – uma vez que esta apenas se encontrava presente em mosto não-tratado.

Já para o mosto 2, os plaqueamentos no tempo zero quer para o mosto tratado, quer para o mosto não-tratado em reator óhmico não obtiveram crescimento microbiano (ver Figura 33). Pode então concluir que o mosto se encontrava desprovido de microbiota intrínseca proveniente dos passos pré-fermentativos, ou que a mesma não terá resistido às condições de armazenamento (-18 °C sem a circulação de ar). Uma vez que o mosto 1 era provido de microbiota nativa, poder-se-á considerar que a porção de mosto vertida para o recipiente selecionado para os ensaios

**Tabela 5.** Espécies com maior presença identificadas por crescimento em placa usando meio WL

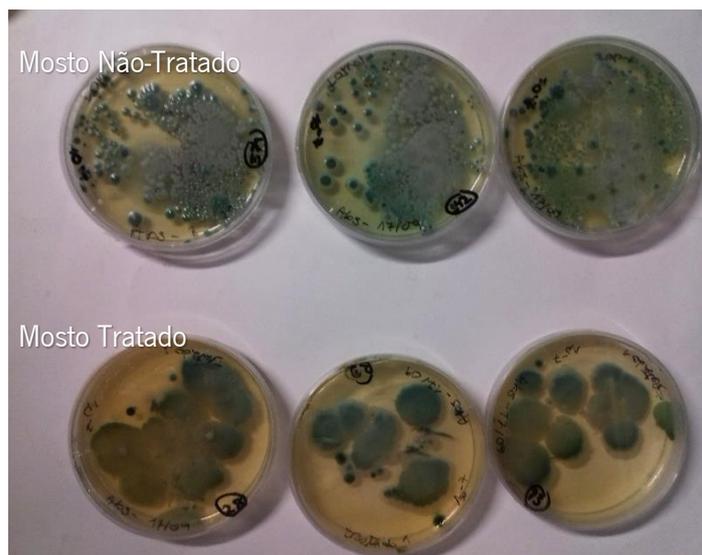
Morfologia	Espécie
	<i>P. membranifaciens</i>
	<i>H. uvarum</i>
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>



**Figura 31** Espécies presentes no mosto 1 tratado e não-tratado no momento logo após o tratamento.

de tratamento óhmico, caracterização e análise de tempo de prateleira teria uma concentração celular inferior ao restante mosto, tendo esta sido mais afetada pelas condições de armazenamento do mosto até ao momento dos ensaios.

Após um período de quatro dias a uma temperatura de 5 °C, foi possível verificar a presença *H. uvarum* e de fungos (entre eles a *P. membranifaciens*) nas placas referentes ao mosto não-tratado– e ainda a presença de uma espécie que ganhou a tonalidade azul com o decorrer do tempo. Este pormenor possivelmente assinala esta espécie como sendo *Pichia anomala*.



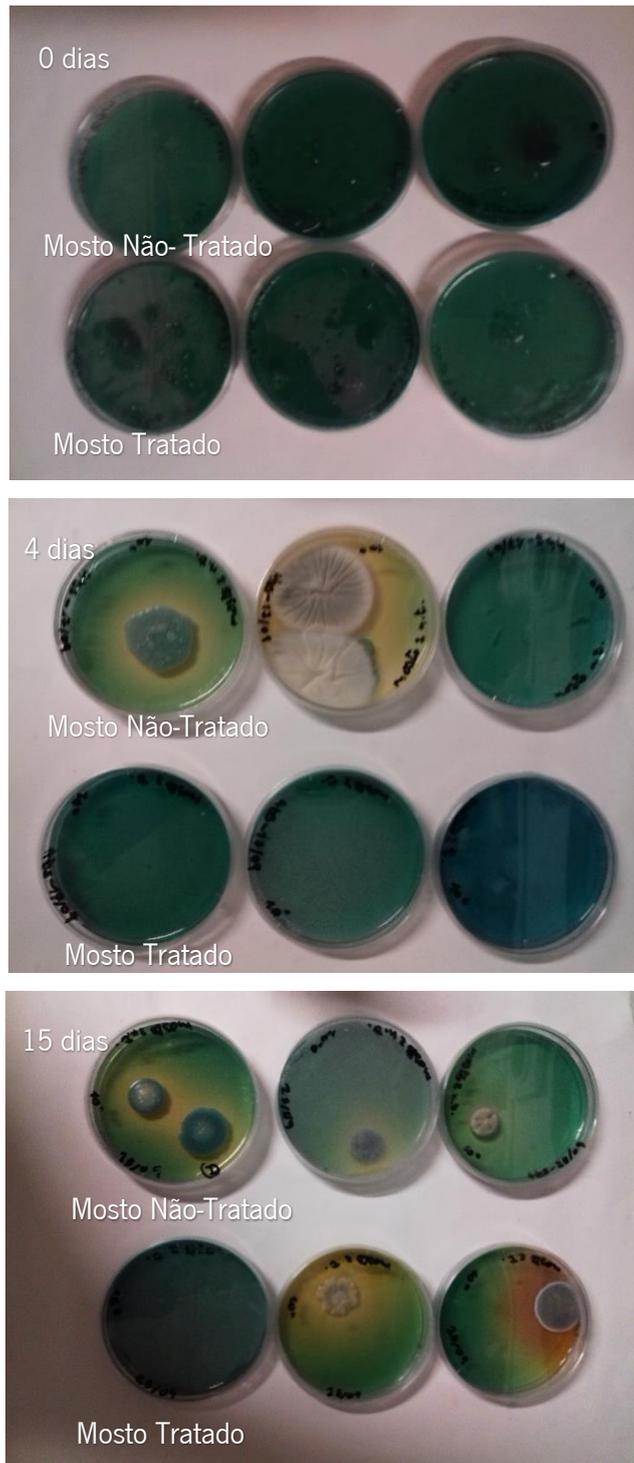
**Figura 32** Espécies presentes no mosto 1 tratado e não-tratado passados 11 dias.

Passados sete dias, verificou-se nas placas de mosto não-tratado a presença de um maior número de fungos, bem como de bactéria ácidas acéticas, e ainda a presença de *H. uvarum* e de uma colônia de *P. anomala*. Já nas placas de mosto tratado, não se observou crescimento de qualquer espécie de microrganismo.

Após 15 dias, verificou-se novamente a presença de fungos, estando agora presente tanto nas amostras de mosto tratado como de mosto não-tratado. Houve também a ocorrência da mesma espécie considerada ser *P. anomala* e ainda a presença de *H. uvarum* em mosto não-tratado. Contudo, as contagens em placa foram de tal maneira reduzidas, que não se poderão considerar como dados viáveis acerca da variedade de microrganismos e a sua concentração – uma vez que, no caso dos fungos, estes poderão representar contaminações pós-tratamento.

Ainda foi feita a caracterização do mosto 3, onde se verificou novamente um domínio pela espécie *H. uvarum*, seguida pela *S. pombe* – apesar de esta última espécie não estar presente nas amostras não-tratadas, está presente nos restantes plaqueamentos de tempo de prateleira – com uma grande quantidade de colônias redondas com coloração verde intenso – maior para mosto não-tratado do que para o mosto tratado, o que sugere algum efeito de inativação. Houve uma grande ocorrência de bactérias ácido acéticas e o aparecimento de espécies de fungos filamentosos (tendo estes possivelmente estado presentes no meio e beneficiado da redução da competitividade do mesmo). Verificou-se ainda um caso em que esteve presente a *P. anomala* passados 11 dias.

Os efeitos de inativação observaram-se mais eficientes nas espécies *S. pombe* – tendo



**Figura 33** Imagens capturadas, respectivamente, logo após o tratamento e passado um período de 4 e 15 dias de crescimento em placa.

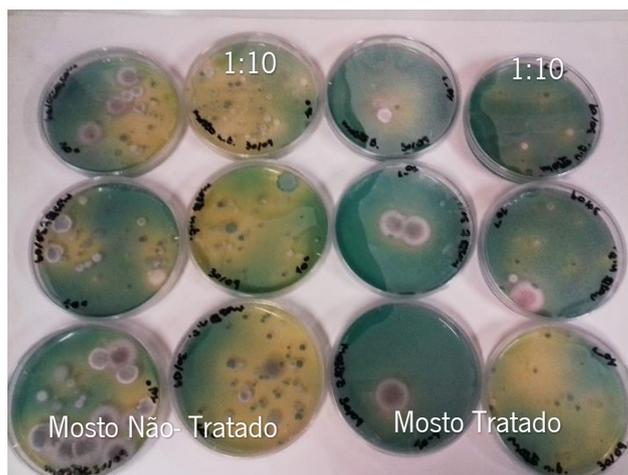
esta rondado dos 57,5% – e, possivelmente, nas bactérias ácido acéticas uma vez que se observou uma redução do seu número, tendo sido menos eficiente na inativação da espécie desconhecida de coloração verde intenso. No entanto, verifica-se uma redução do número de microrganismos

para todas as espécies encontradas no mosto tratado (em relação ao mosto não-tratado) no plaqueamento realizado passados 11 dias, com exceção das colônias de *P. anomala*.



**Figura 34** Imagens capturadas do mosto 3 no momento zero e 11 dias depois.

Para o mosto 4, o tratamento foi bem sucedido na inativação de *H. uvarum* (91,7 % de inativação), de *P. anomala* (95,5 % de inativação), na inativação de colônias redondas com coloração verde intensa (86,7 % de inativação), e na inativação de várias espécies de fungos filamentosos, excetuando o caso de fungos com coloração vermelha na sua base, onde se verificou uma maior presença nas placas de mosto tratado – sugerindo que esta espécie começou a dominar o meio com a redução da competição das outras espécies microbianas. O tratamento não teve, contudo, efeito na concentração da presença da espécie *S. pombe*. Verificou-se um domínio das espécies *H. uvarum* nas placas de mosto não-tratado e um maior domínio de espécies de fungos e de *S. pombe* nas placas de mosto tratado, havendo também a presença de bactérias ácido acéticas em ambos os mostos.



**Figura 35** Imagem capturada do mosto 4 sem diluição seguida de uma diluição de 1:10.

Considera-se que a espécie de microrganismo mais frequente nas amostras de mosto estudadas foi a *Hanseniaspora uvarum*, a *Schizosaccharomyces pombe*, espécies de fungos filamentosos e a espécie desconhecida com coloração verde intenso, concluindo-se também que o tratamento óhmico tem efeitos de inativação visíveis no tratamento do mosto. Recomenda-se realizar um acesso às condições de operação que melhor executem essa inativação.

#### **4.7. Microvinificação do Mosto Não-Tratado e do Mosto Tratado por Aquecimento Óhmico**

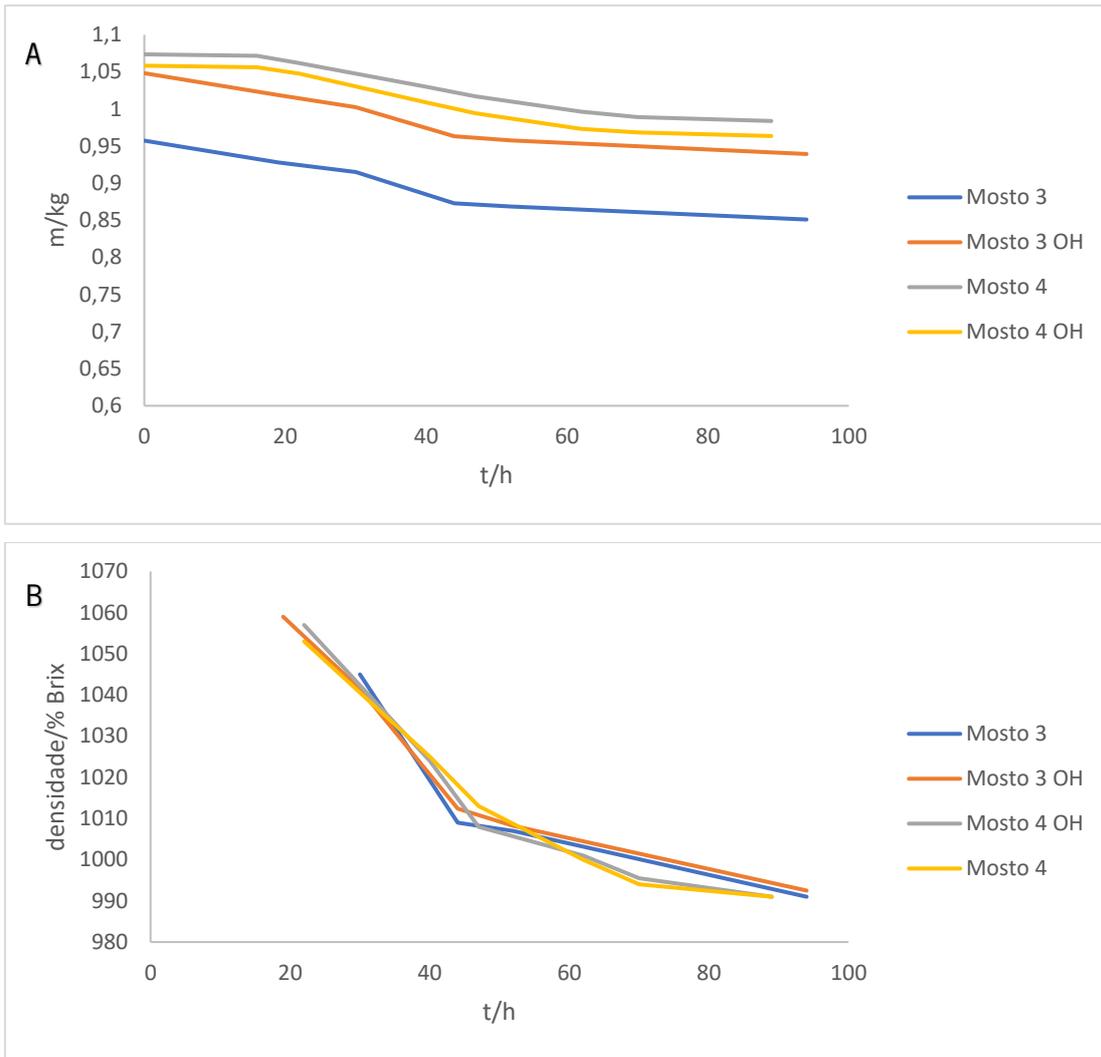
Numa tentativa de apurar se o tratamento óhmico terá algum efeito no desenvolver da fermentação alcoólica do vinho, procedeu-se a duas microvinificações do mosto do vinho, usando para ambos os ensaios tanto o mosto tratado por aquecimento óhmico nas condições mais promissoras, com o mosto que não sofrera qualquer tipo de tratamento (por exemplo, adição de sulfitos). Foram vigiados certos parâmetros de modo a fazer o seguimento dos passos da fermentação, sendo estes a medição do pH, densidade, peso, temperatura, concentração de açúcares redutores – sendo que a variação da concentração de açúcares redutores se encontra exposta na Figura 63 do Anexo II, pelo facto de este parâmetro não ser considerado um parâmetro relevante no seguimento da fermentação alcoólica.

Os resultados obtidos encontram-se expostos nas Figuras 36, 37 e 38, que demonstram que houve uma diminuição do peso, densidade e pH para todas as amostras de mosto. Caso este que seria de esperar, pois com o consumo dos açúcares e formação de etanol e dióxido de carbono, o mosto tende a ficar cada vez mais leve, menos denso – já que o etanol possui menor densidade do que a maioria dos açúcares – e mais ácido – o que causa o abaixamento do pH. A única exceção será o caso do mosto 4 tratado, cujos valores de pH sofrem uma subida a partir

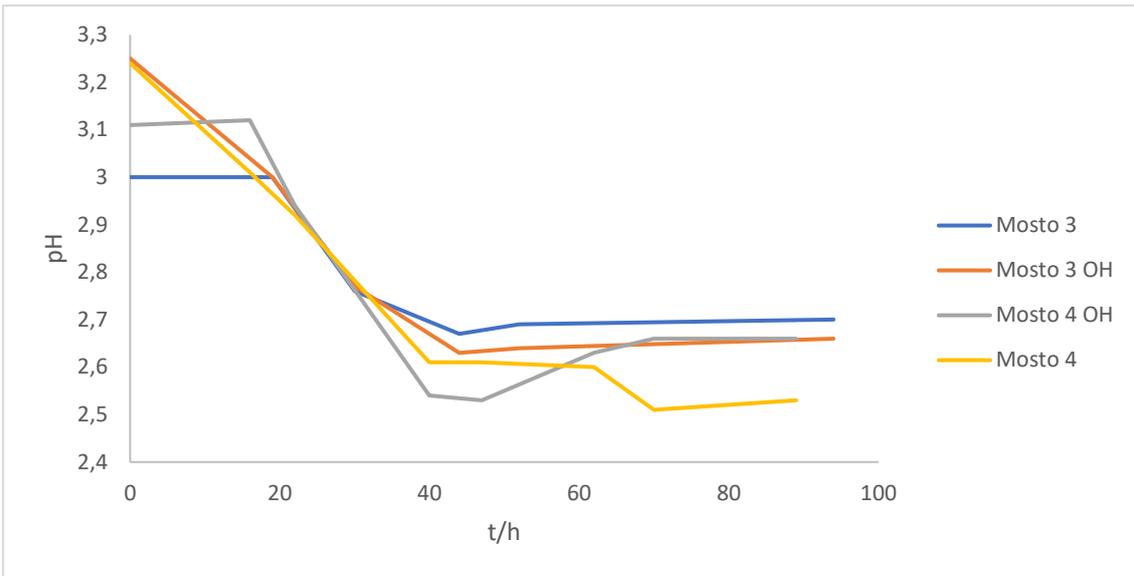
das 60 h de fermentação. Isto pode dever-se a uma má homogeneização do meio anterior à medição. Em todo o caso, em trabalhos futuros será um parâmetro a averiguar.

Já a temperatura sofreu oscilações pequenas, permanecendo numa gama de 21 °C a 24 °C, mas foi possível assistir à sua diminuição, mais claramente a partir das 50 h de fermentação. A temperatura inicial de 17 °C do mosto 4 não-tratado deve-se pelo facto de este mosto ter iniciado a fermentação pouco tempo depois de ter sido retirado da refrigeração, não tendo tempo para atingir a temperatura ambiente. No entanto, os restantes parâmetros encontram-se de acordo com o esperado e de acordo com o comportamento dos restantes mostos, provando que este não terá atrasado – nem foi um fator de peso – durante o início ou no decorrer da fermentação.

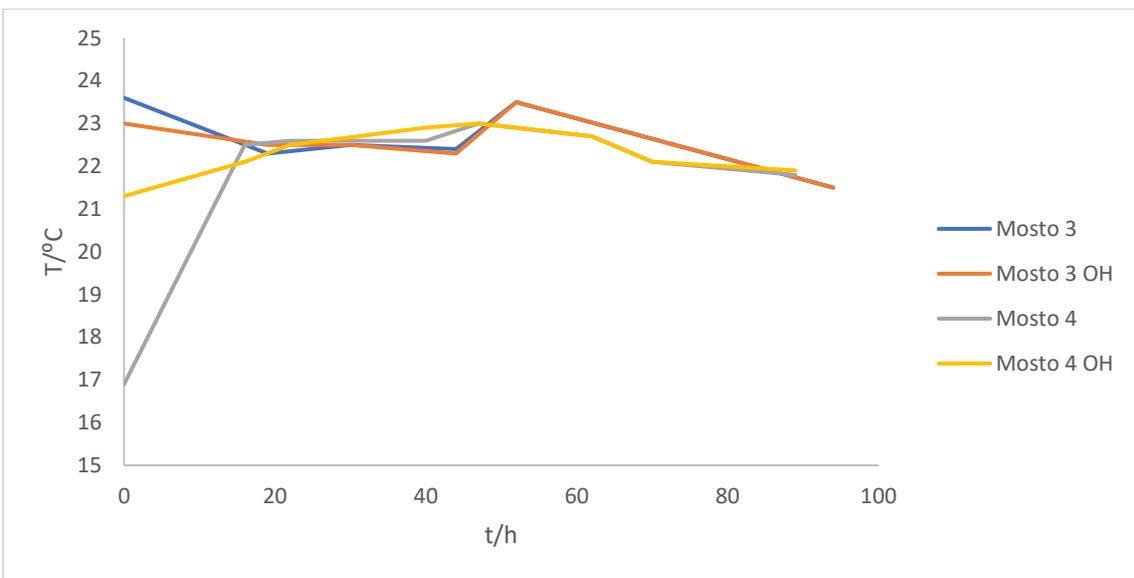
Pode-se considerar, com os dados expostos nesta secção, que o tratamento óhmico não tem nenhum efeito notório em comparação à fermentação de mosto que não sofreu nenhum tratamento prévio, de modo que a aplicação deste na produção de vinho deverá ser impercetível no que diz respeito aos parâmetros estudados neste trabalho.



**Figura 36** Variação do peso dos mostos (A) e da densidade (B) ao longo do tempo de fermentação em mosto tratado e não-tratado no decorrer de duas microvinificações distintas.



**Figura 37** Variação do pH (B) dos mostos ao longo do tempo de fermentação em mosto trastado e não-trastado no decorrer de duas microvinificações distintas.



**Figura 38** Variação da temperatura ao longo do tempo de fermentação em mosto tratado e não-trastado no decorrer de duas microvinificações distintas.



**Figura 39** Análise visual dos mostos submetidos a tratamento óhmico e não submetidos a tratamento óhmico.

## 5.1 Conclusões

No estudo das condições de inativação ótimas da estirpe de levedura *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801, foi possível constatar o impacto da componente elétrica na respetiva inativação. Tratamentos a temperaturas em que o efeito de inativação térmico era isolado – 40 °C – com ausência de campos elétricos ou presença de campos elétricos baixos – menor do que 100 V/cm – foi verificado que o efeito de inativação era nulo ou bastante inferior ao visualizado nos ensaios em que se utilizaram campos elétricos moderados – a partir de 400 V/cm. Tal acontecimento foi continuamente confirmado ao longo dos ensaios sendo possível concluir que a presença de campos elétricos moderados provocaram efeitos de inativação distintos sobre o inóculo de levedura isolada. Foi verificado também que a inativação da levedura foi possível através de tratamentos de 20 min, com temperaturas máximas de tratamento de 40 °C (temperaturas médias de tratamento aproximadamente superiores a 30 °C) e campos elétricos de 400 V/cm. Esta inativação revelou-se total em alguns casos (> 5 log) ou parcial (< 1 log), dependendo da condutividade elétrica das soluções tratadas. O tratamento poderá, então, ser aplicado durante o armazenamento do mosto sempre que se justificar de forma a controlar o desenvolvimento de leveduras não desejadas ou utilizado em sinergia com a adição de SO<sub>2</sub> em quantidades significativamente menores do que as utilizadas convencionalmente.

Na caracterização físico-química dos mostos, não foi observada uma variabilidade acentuada dos parâmetros estudados. Também, na caracterização microbiológica dos mostos, verificou-se a maior presença das espécies *Hanseniaspora uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe*, de espécies de fungos filamentosos e de uma espécie desconhecida de coloração verde intenso. Apurou-se ainda que o Aquecimento Óhmico tem efeitos na inativação das espécies presentes em maiores concentrações nas amostras de mosto não-tratado, com a exceção das espécies de fungos filamentosos, uma vez que estes poderão ter tido a oportunidade de se proliferarem devido à redução da competitividade. Já na fermentação, a realização de tratamento óhmico não alterou as propriedades físico-químicas do mosto, nem inibiu o desenvolvimento normal da etapa de fermentação.

## 5.2. Principais Recomendações e Trabalho Futuro

Para estudos futuros, recomenda-se o uso de diferentes meios de caracterização microbiológica de forma a complementar a caracterização realizada das espécies de leveduras e bactérias, bem como averiguar qual a sua percentagem relativa quer para mosto tratado, como para mosto não-tratado, de modo a aprofundar o estudo da sensibilidade das espécies microbianas ao tratamento.

Seria aconselhada a análise do efeito de inativação do mosto (e sucessivo estudo de tempo de prateleira) utilizando um sistema que melhor reproduza as condições e valores de campo elétrico reportadas para que o aumento de escala do processo garanta o mesmo efeito de inativação observado à escala laboratorial. Também seria necessário a construção de curvas de morte térmica utilizando as condições ótimas manifestadas neste trabalho, calculando os valores D e z para tratamentos térmicos dentro dos intervalos usados nos processos de remoção do SO<sub>2</sub> de modo a obter-se um estudo e melhor compreensão da cinética de morte da levedura-alvo e consequente alteração das propriedades do mosto.

Outro fator de investigação pode residir numa maior elucidação do vetor de inativação, se este se deve à intensidade do campo elétrico, densidade da corrente elétrica ou frequência elétrica. Para isso se necessária uma maior avaliação do papel da condutividade elétrica na eficácia dos tratamentos.

De modo a averiguar as vantagens do tratamento óhmico em mosto de vinho, seria recomendado o seguimento e comparação de mosto tratado por este mesmo tratamento, a mosto tratado pelo método convencional, e ainda mosto submetido a sulfitação, assim como um estudo das suas propriedades físico-químicas e caracterização microbiológica.

De modo a avaliar a implementação da tecnologia em todos os produtos da empresa, é recomendado que a mesma abordagem de tratamento possa ser aplicada para o Vinho Verde tinto. E ainda, com a tentativa de eliminar o processo de sulfitação por completo do processo produtivo de Vinho Verde, recomenda-se a aplicação da tecnologia após a fermentação, com estudo dos efeitos de inativação da levedura fermentativa e possível impacte nas características físicas e químicas do vinho.

## **Bibliografia**

Anli, E., Ozturk, B. (2017). Pulsed electric fields (PEF) applications on wine production: A review. *BIO Web of Conferences* 9, 02008.

Bawa, A., Pandey, M., Radhakrishna, K., Varghese, K. (2014). Technology, applications and modelling of ohmic heating: a review. *Journal of Food Science and Technology*, (October 2014) 51(10):2304–2317

Bartowsky, E. J. (2009) Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 149–156.

Blaiotta, G., Lisanti, M., Nioi, C., Moio, L. (2019). Alternative Methods to SO<sub>2</sub> for Microbiological Stabilization of Wine. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, vol. 18.

Blomqvist, J., Passoth, V. (2015). Dekkera bruxellensis—spoilage yeast with biotechnological potential, and a model for yeast evolution, physiology and competitiveness. *FEMS Yeast Research*, 15 (2015), fov021.

Boussetta, N., Delsart, C., Ghidossi, R., Grimi, N., Peuchot, M., Sertier, C., Vorobiev, E. (2015). Impact of pulsed-electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 152–164.

Cardoso, R., Custódio, V., Egas, C., Fernandes, J., Gomes, A., Pinheiro, M., Pinho, D., Pinto, C., Sousa, S. (2015). Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 6, 1664-302X.

Chen, P., Lim, S., Mok, C., Park, Y., Ruan, R., Song, K. (2006). High Hydrostatic Pressure Pasteurization of Red Wine. *JFS M: Food Microbiology and Safety - Journal Of Food Science*, Vol. 71, no. 8.

CHS Protocols (2019). Methylene Blue Solution. Retrieved on 22/05/2019 from <http://cshprotocols.cshlp.org>

Coimbra, M., Nunes, C., Santos, M., Saraiva, J. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234:1–12.

CVRVV. (2015). Regulamento de Produção e Comércio da DOO Vinho Verde – Versão Consolidada 13.06.2015 DJ CVRVV.

CVRVV. (2019). Portal do Vinho Verde. Retrieved on 25/09/2019 from <http://www.vinhoverde.pt/pt/estatisticas#!>

Dashko, S., Ishchuk, O., Piškur, J., Schifferdecker, A. (2014). The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast: Yeast Primer*, 2014; 31: 323–332.

Durner, D., Diesler, K., Golombek, P., Kromm, L., Stahl, M., Briviba, K., Scharfenberger-Schmeer, M., Fischer, U. (2017). Inactivation of microorganisms by UV-treatment of must and wine. 40<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine - BIO Web of Conferences 9, 02001.

FAO. (2007). Code of Practice for the Prevention and Reduction of Ochratoxin A Contamination in Wine, 1–6.

FAO, & WHO. (2016). Discussion Paper on the Use of Food Additives in the Production of Wine, 1–10.

Ferreira, J. (2004). Factors influencing the fermentation performance of commercial wine yeasts. Stellenbosch University, 2004.

Harding, J., Robinson, J., Vouillamoz, J. (2012). Wine Grapes – A Complete Guide to 1.368 Vine Varieties, Including Their Origins and Flavours. *Harper Collins*, 1st Edition, 7–18.

IVV. (2019). Parâmetros Analíticos. Retrieved on 2/10/2019 from <https://www.ivv.gov.pt/np4/np4/89>

Jackson R.S. (2008) Wine Science – Principles and Applications. *Academic Press*, 3rd Edition; 1–14, 332–417.

Kaur, N. & Singh, A. K. (2016) Ohmic Heating: Concept and Applications—A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:14, 2338-2351.

Kima, N., Kimb, C., Lee, B., Rhee, M., Ryanga, J. (2017). Continuous ohmic heating of commercially processed apple juice using five sequential electric fields results in rapid inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 246 (2017) 80–84.

- Lelieveld, H., Mostert, M., Holah, J. (2005). Handbook of Hygiene Control in the Food Industry. *Woodhead Publishing in the Food Science and Technology*. Cambridge, England.
- Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P. (2019). Encyclopedia of Food Chemistry, Vol. 2.
- Mok, C., Puligundla, P., Pyun, Y. (2018). Pulsed electric field (PEF) technology for microbial inactivation in low-alcohol red wine. *Food Science Biotechnology* (2018) 27(6):1691–1696.
- OIV (2012). OIV Guide For Implementation Of The HACCP System (Hazard Analysis And Critical Control Points) To Viticulture Resolution. OIV-Viti, 469-2012.
- OIV (2018). Global Economic Vitiviniculture Data - Press Release.
- OIV (2019). Member States and Observers. Retrieved on 10/10/2019 from <http://www.oiv.int/en/the-international-organisation-of-vine-and-wine/member-states-and-observers>
- Pereira, R., Martins, J., Mateus, C., J., Teixeira, J., Vicente, A. (2007). Death Kinetics of *Escherichia coli* in Goat Milk and *Bacillus licheniformis* in Cloudberry Jam Treated by Ohmic Heating. *Chem. Pap.*, 61 (2) 121–12.
- Puxeu, M., Martín, L. (2018). Microbiological, Physical, and Chemical Procedures to Elaborate High-Quality SO<sub>2</sub>-Free Wines. *Grapes and Wines - Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*, 1st Edition.
- Santos, P., & Rodrigues, R. (2018). Electric field-based technologies for valorization of bioresources. *Bioresource Technology*, 254 (March), 325–339.

## Anexos

### Anexo I - Composição do meio WL

Composto	Concentração/g·L <sup>-1</sup>
Glucose	50,0
Agar	12,0
Peptona	5,0
Extrato de levedura	4,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
KCl	425,0 × 10 <sup>-3</sup>
CaCl <sub>2</sub>	125,0 × 10 <sup>-3</sup>
MgSO <sub>4</sub>	125,0 × 10 <sup>-3</sup>
Verde de Bromocresol	22,0 × 10 <sup>-3</sup>
FeCl <sub>3</sub>	2,5 × 10 <sup>-3</sup>
MnSO <sub>4</sub>	2,5 × 10 <sup>-3</sup>

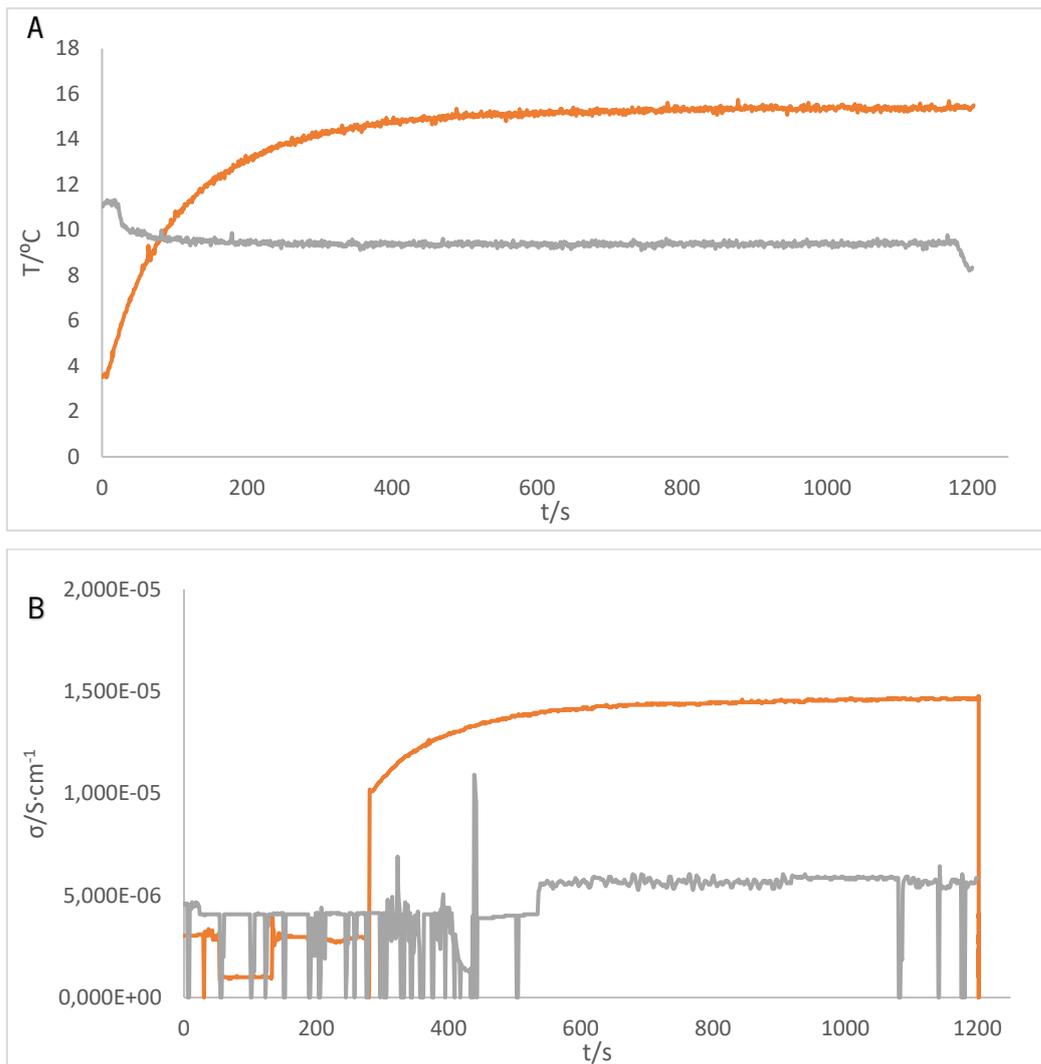
### Anexo II - Ensaio Complementares

#### Primeiro Ensaio Para a Avaliação Preliminar em Levedura Isolada – Protocolo II

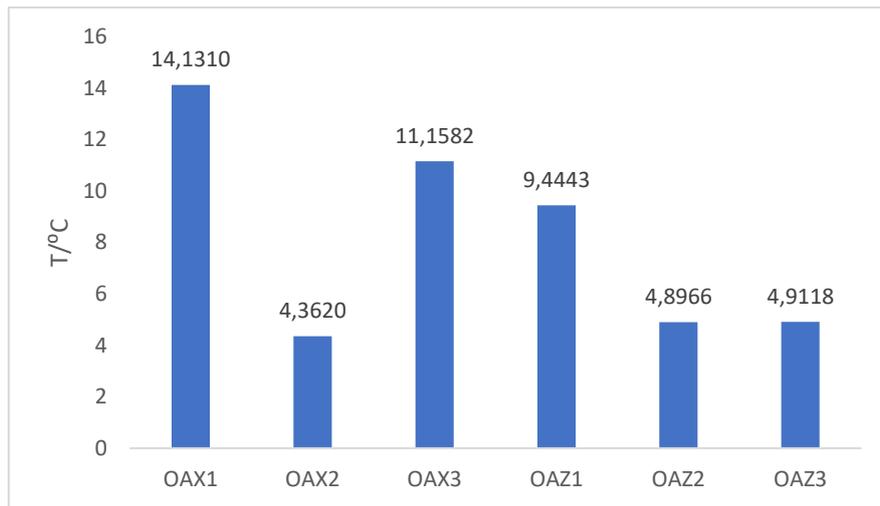
Foi fixada uma temperatura de tratamento de 40 °C e foram utilizados dois campos elétricos – 400 V/cm e 600 V/cm – durante um tempo de tratamento total de 20 min. Porém, devido à baixa condutividade dos novos stocks de produção de levedura utilizados (< 2 µS/cm) não foi possível combinar o efeito elétrico com o efeito térmico, como ilustra a Figura 41. Apesar de o meio permitir, a passagem de corrente em alguns momentos foi residual, sendo que a reduzida dissipação de calor não permitiu o aumento da temperatura do inóculo. Como é possível ver através da Figura 42, as temperaturas médias de tratamento não atingiram os 20 °C.

Apesar das baixas temperaturas de tratamento, é possível observar uma redução do número de células, com a exceção do tratamento a 400 V/cm e 40 °C, em que pontualmente não se verificou efeito de inativação suficiente para que houvesse redução do número de células viáveis, com valores de concentração de aproximadamente 3,6·10<sup>6</sup> UFC/mL – o que justifica o erro padrão elevado. É possível, no entanto, observar mais claramente a redução de 1 log com o aumento do campo elétrico para 600 V/cm, embora tenham sido detetadas algumas contaminações pontuais de uma outra espécie microbiana em várias placas, que poderão ter influenciado o número de UFC's de *Dekkera bruxellensis*. O conjunto destes resultados confirma

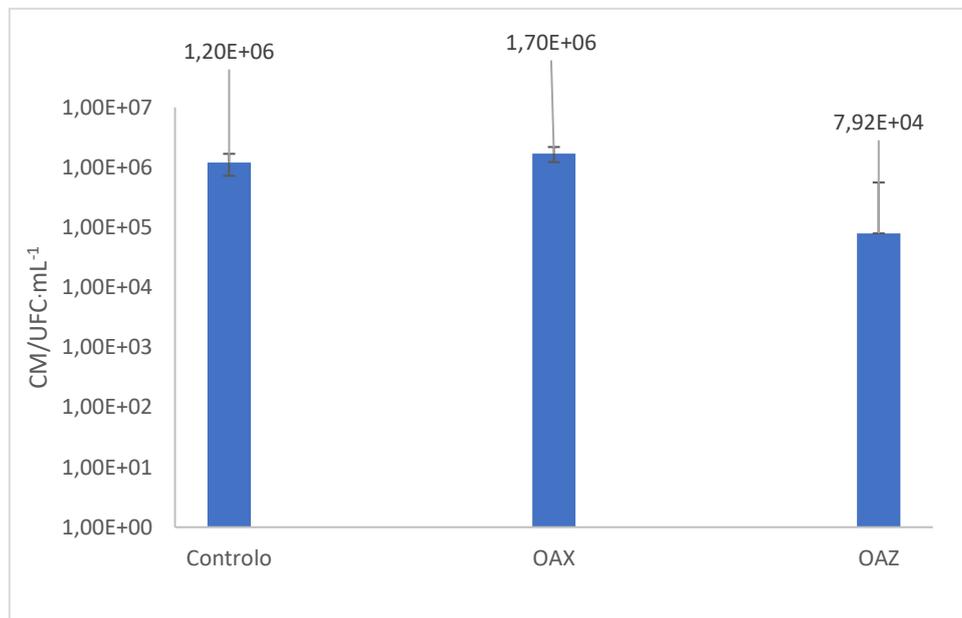
a possibilidade de tratamento elétrico com eficiência na inativação de levedura, a uma temperatura moderada que não trará consequências ao nível da qualidade do mosto.



**Figura 40** Exemplo da variação da condutividade elétrica (A) e temperatura (B), respetivamente, em stock de leveduras de baixa condutividade com aplicação de campos elétricos de 400 V/cm – representado a laranja – ou 600 V/cm – representado a cinza – por 20 min de tratamento.

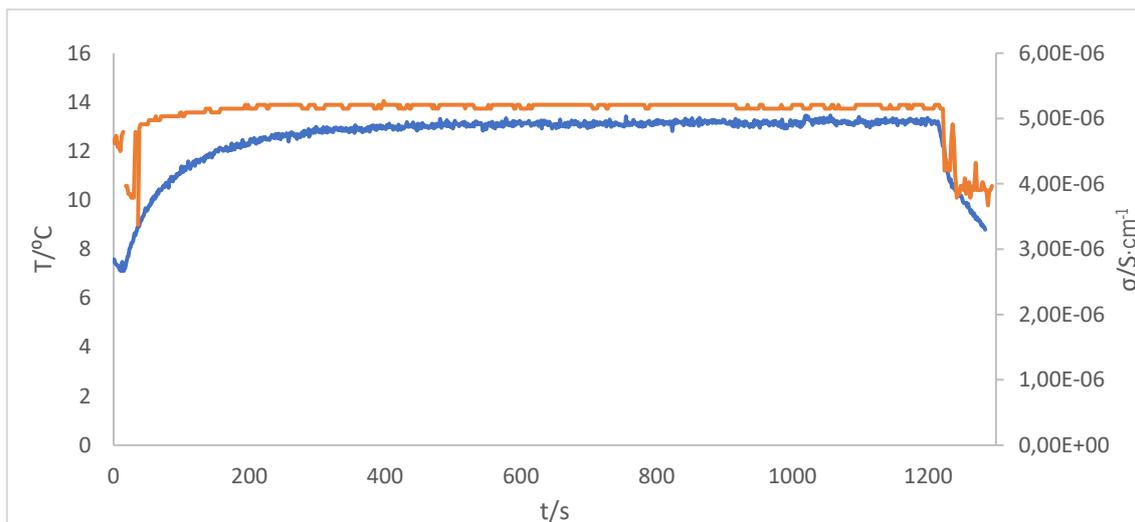


**Figura 41** Temperatura média de tratamento para cada amostra submetida a tratamento óhmico.

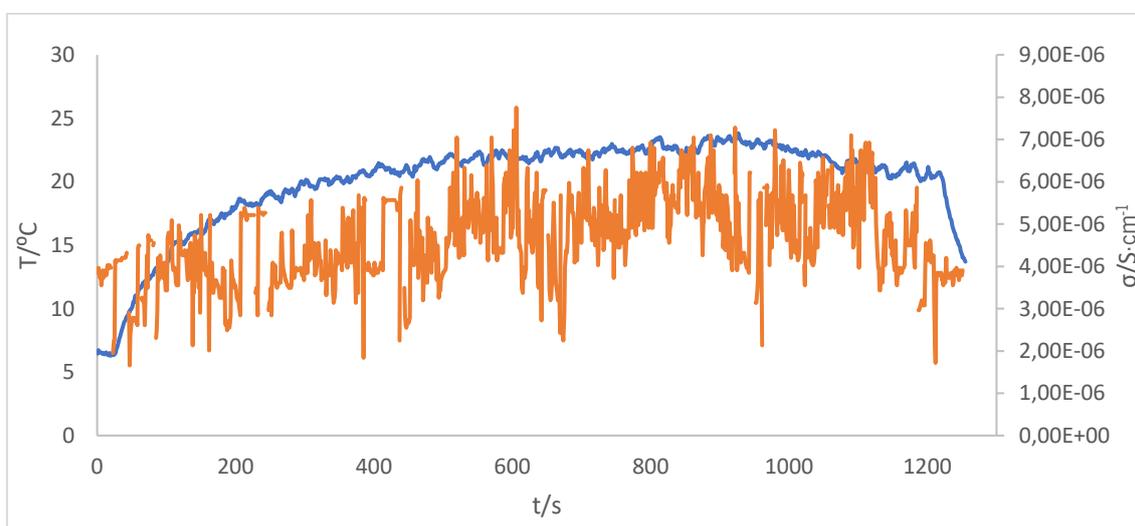


**Figura 42** Concentrações celulares obtidas do controlo e de cada amostra tratada no reator de tratamento óhmico.

As seguintes figuras, Figura 43 e 44, remetem aos ensaios OBZ2 e OBZ3 correspondentes ao segundo ensaio em que foi seguido o Protocolo II. É visível os baixos valores de condutividade elétrica e uma baixa subida de temperatura.



**Figura 43** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) da amostra OBZ2.



**Figura 44** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) da amostra OBZ3.

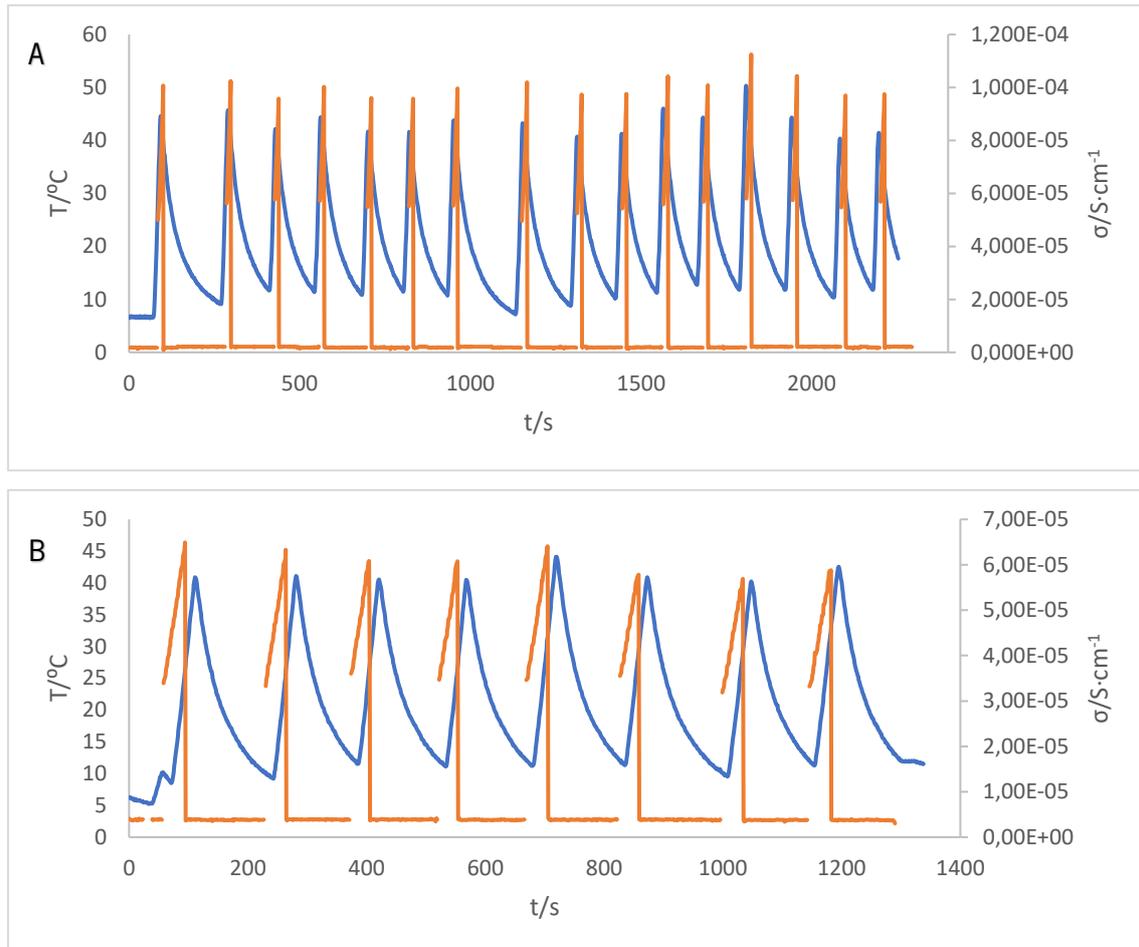
### **Avaliação Preliminar Em Levedura Isolada – Protocolo III**

Da adição de solução PBS ao inóculo antes do tratamento resultou uma condutividade inicial do inóculo de  $26 \mu\text{S}/\text{cm}$ , que se encontrava dentro duma gama funcional de condutividade elétrica, pelo que não era demasiado alta para tornar a variável de temperatura difícil de controlar, e não era demasiado baixa para impossibilitar o efeito do campo elétrico. Desta maneira, foram testados dois valores de campo elétrico diferentes – de  $600 \text{ V}/\text{cm}$  e  $400 \text{ V}/\text{cm}$ , na respetiva ordem.

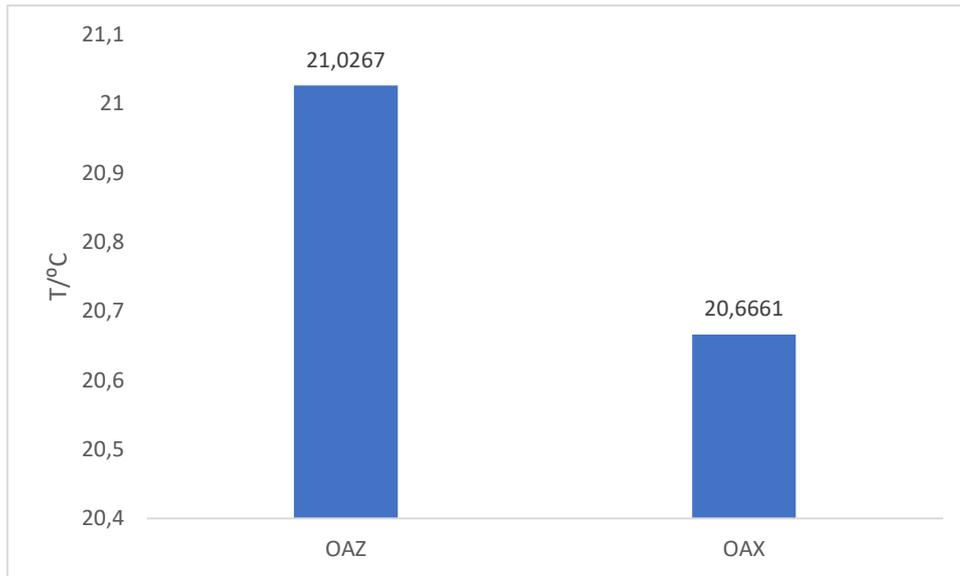
Na Figura 45 poderão ser observadas as alterações da temperatura e da condutividade elétrica para ambos os ensaios. Como é possível verificar, a condutividade elétrica atingiu valores mais altos para o campo elétrico superior, gerando uma intensidade de corrente maior a circular

entre os elétrodos, o que causou subidas de temperatura mais rápidas, menos controláveis e mais ciclos de aquecimento e arrefecimento do inóculo.

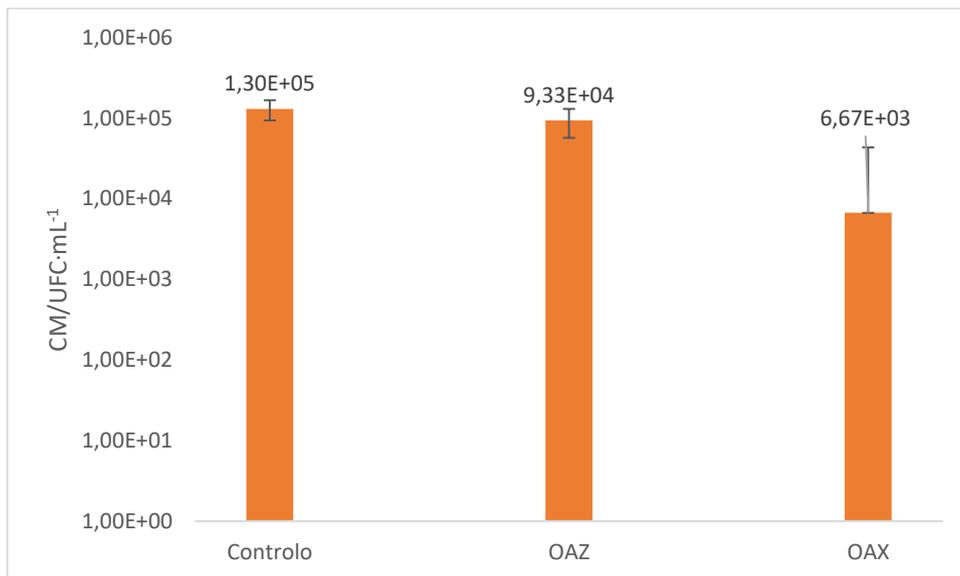
Uma vez que o inóculo mantido dentro do reator foi o mesmo entre as aplicações de campos elétricos de 600 V/cm e 400 V/cm, fará sentido que a concentração celular da amostragem de 400 V/cm terá sofrido um maior declínio uma vez que esta mesma amostra já havia sido submetida ao tratamento de 20 min e um campo elétrico de 600 V/cm.



**Figura 45** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para o ensaio a 600 V/cm (A) e 400 V/cm (B), ambos a uma temperatura de ensaio de 40 °C durante um intervalo de 20 min.



**Figura 46** Temperaturas médias de tratamento aquando testado o aquecimento óhmico.



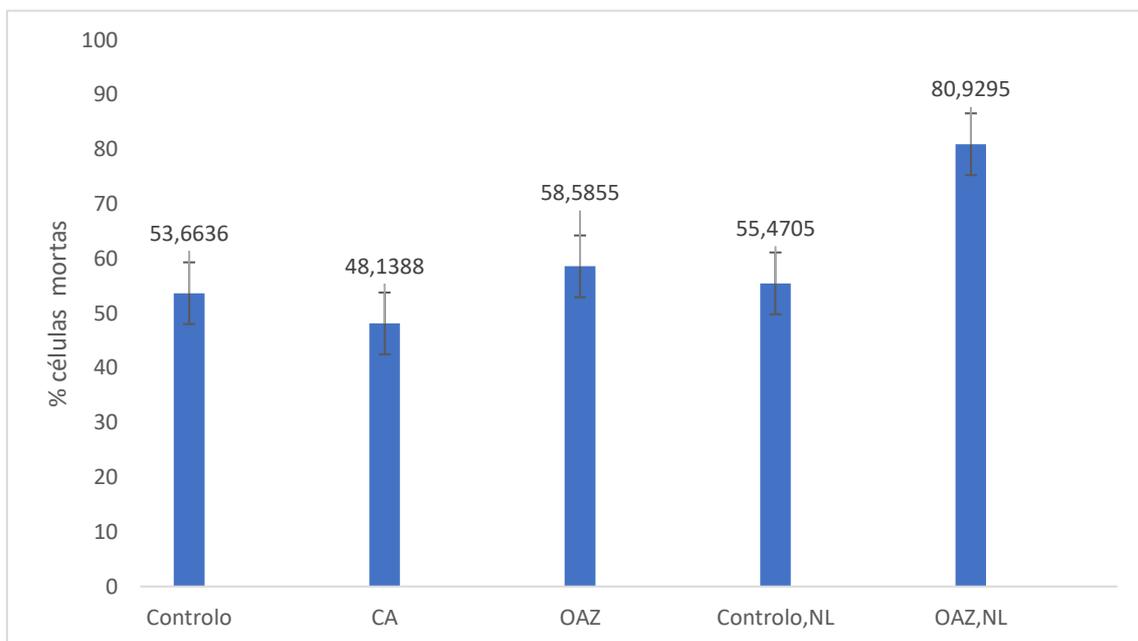
**Figura 47** Concentração celular dos inóculos de controlo e os inóculos submetidos a aquecimento óhmico.



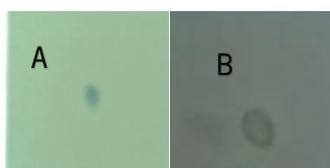
**Figura 48** Imagem captada após um período de oito dias de crescimento em placa.

### Avaliação preliminar em levedura isolada – Protocolo IV

Segue, nesta secção do Anexo II, a exposição dos gráficos criados no seguimento da contagem do número de células por microscopia em câmara de Neubauer.

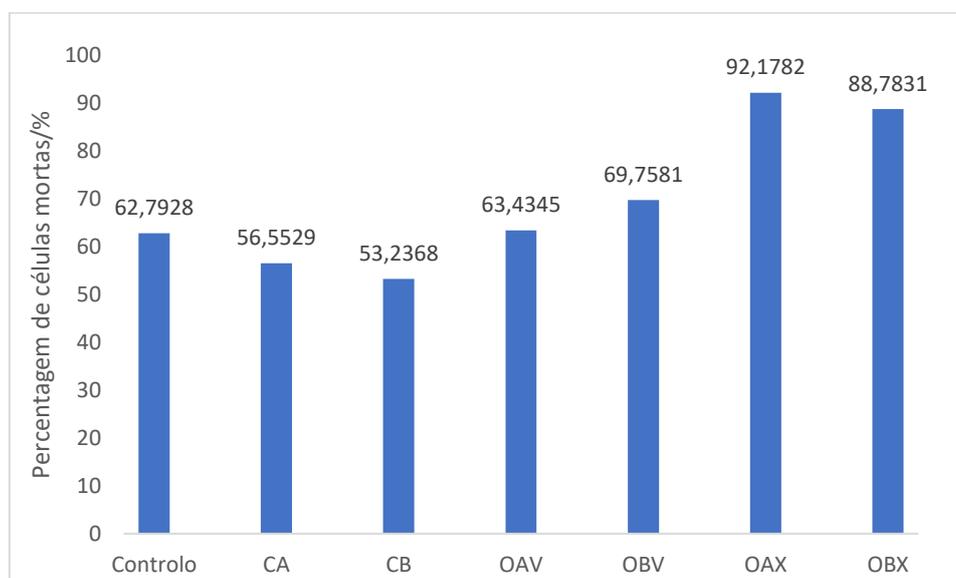


**Figura 49** Percentagem de células mortas das amostras de mosto lavado e não-lavado submetidas a tratamento convencional a 40 °C e a tratamento óhmico à mesma temperatura.



**Figura 50** Imagem capturada de uma célula morta de OAZ,NL (A) e uma célula viva de Controlo,NL (B).

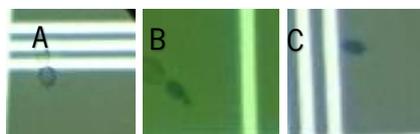
No ensaio relativo às Figuras 49 e 50, havia a presença de um elevado número de aglomerados de células, tendo havido a dificuldade em conseguir a separação dessas células de maneira a poderem ser feitas as respetivas contagens. Também se observou a presença de células com hifas, onde se optou por não fazer a sua contagem uma vez que não se deveriam tratar da *D. bruxellensis*. Não foram visíveis também alterações notórias na morfologia das células entre os inóculos tratados, havendo observado uma diferença de tamanhos entre as células do controlo e as células tratadas por tratamento óhmico – apresentando-se estas maiores que as últimas.



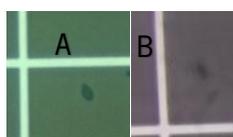
**Figura 51** Percentagem de células mortas das amostras de mosto lavado e não-lavado submetidas a tratamento convencional a 40 °C e a tratamento óhmico à mesma temperatura.

As figuras 51, 52 e 53 representam a contagem de células feitas por microscopia em câmara de Neubauer de um ensaio realizado seguindo o Protocolo IV. Em comparação à Figura 25, os efeitos de inativação não apresentam ser tão aparentes, ainda assim é igualmente visível uma maior presença de células vivas nos ensaios de tratamento convencional, e uma menor

presença de células vivas nos tratamentos a campos elétricos de 400 V/cm e 40 °C. No que toca à morfologia, as células de controlo apresentavam-se de maiores dimensões do que as restantes, enquanto que as células submetidas a tratamento convencional apresentavam uma morfologia alongada em comparação aos outros ensaios.

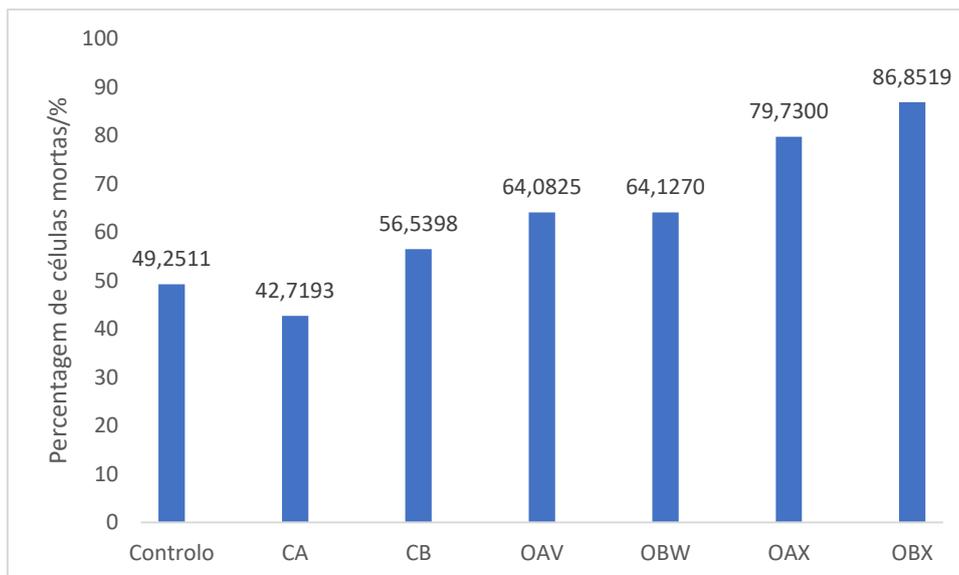


**Figura 52** Imagem capturada de uma célula viva de controlo (A) e células mortas de CA (B) e OAV (C), em câmara de Neubauer.

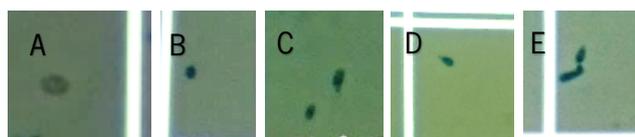


**Figura 53** Imagem capturada em câmara de Neubauer de células mortas de OAX (A) e OBX (B) sem ter sido usada qualquer diluição das amostras.

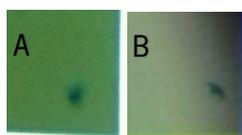
As figuras 54, 55 e 56 representam a análise da morfologia das células feitas em câmara de Neubauer. Foi, em termos de contagens verificado uma percentagem de células mortas menor para CA, bem como uma maior percentagem de células mortas para OAX e OBX – tais factos convergem com o que se foi observado em placa. Já a morfologia das células de controlo apresentaram ter maiores dimensões nas amostras de controlo comparativamente às restantes, sendo estas também mais redondas do que as células submetidas a condições em que houve efeitos da temperatura (apresentando-se estas mais alongadas).



**Figura 54** Percentagem de células mortas das amostras de mosto lavado e não-lavado submetidas a tratamento convencional a 40 °C e a tratamento ôhmico à mesma temperatura.

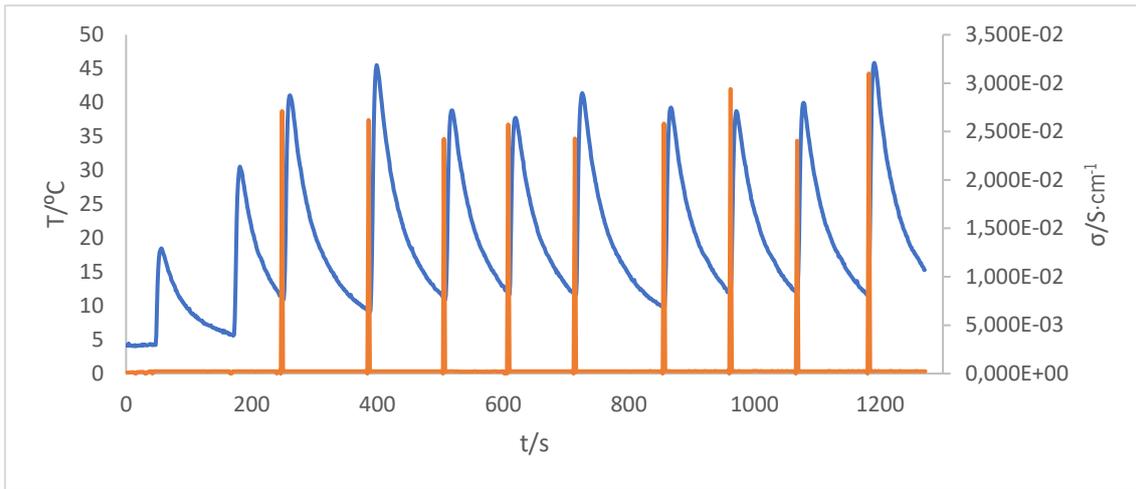


**Figura 55** Imagem capturada em câmara de Neubauer de uma célula viva do Controlo (A) e células mortas de CA (B), CB (C), OAV (D) e OBW (E).

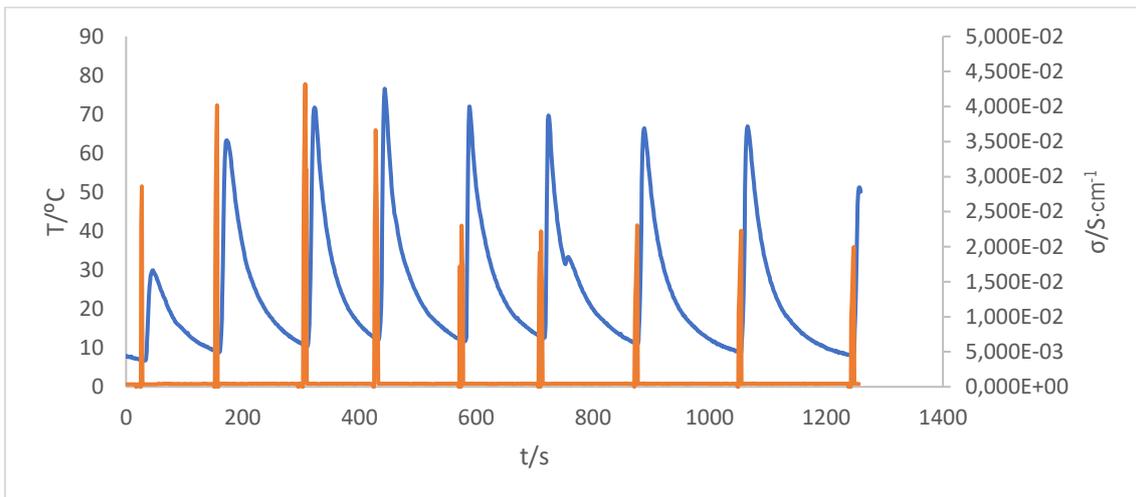


**Figura 56** Imagem capturada em câmara de Neubauer de células mortas de OAX (A) e OBX (B).

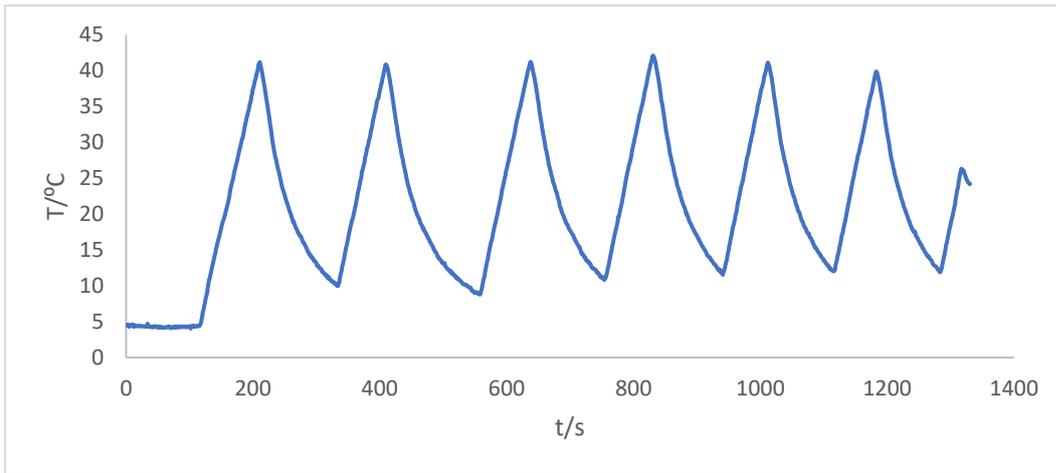
A título expositivo, seguem-se alguns dos gráficos da variação da temperatura e condutividade elétrica referentes ao ensaio que seguiu as premissas do Protocolo IV, o qual também foi seguido de um estudo do tempo de prateleira dos inóculos tratados e não-tratado.



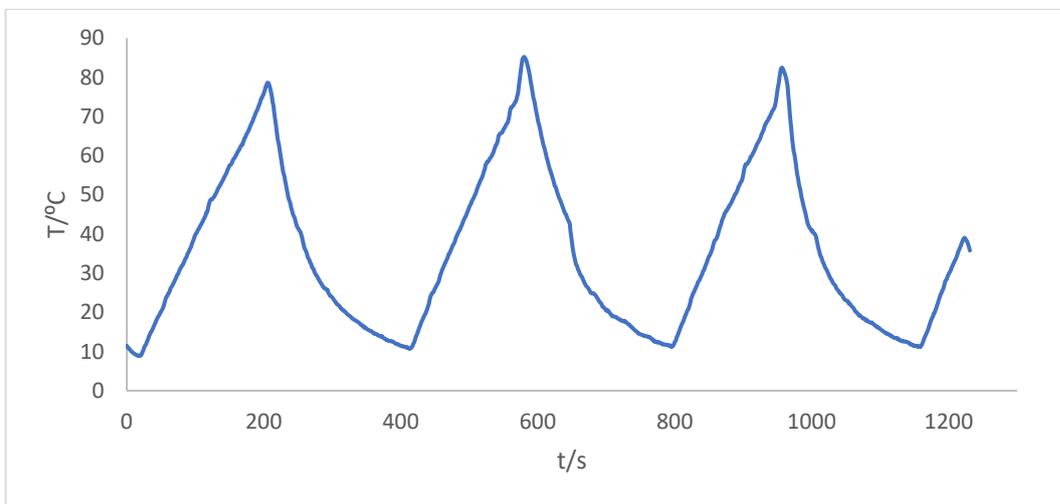
**Figura 57** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para um tratamento de inóculo de levedura não-lavado com campo elétrico de 400 V/cm e uma temperatura máxima de 40 °C durante um intervalo de tempo de 20 min.



**Figura 58** Variação da temperatura (azul) e condutividade elétrica (laranja) para um tratamento de inóculo de levedura não-lavado com campo elétrico de 400 V/cm e uma temperatura máxima de 75 °C durante um intervalo de tempo de 20 min.



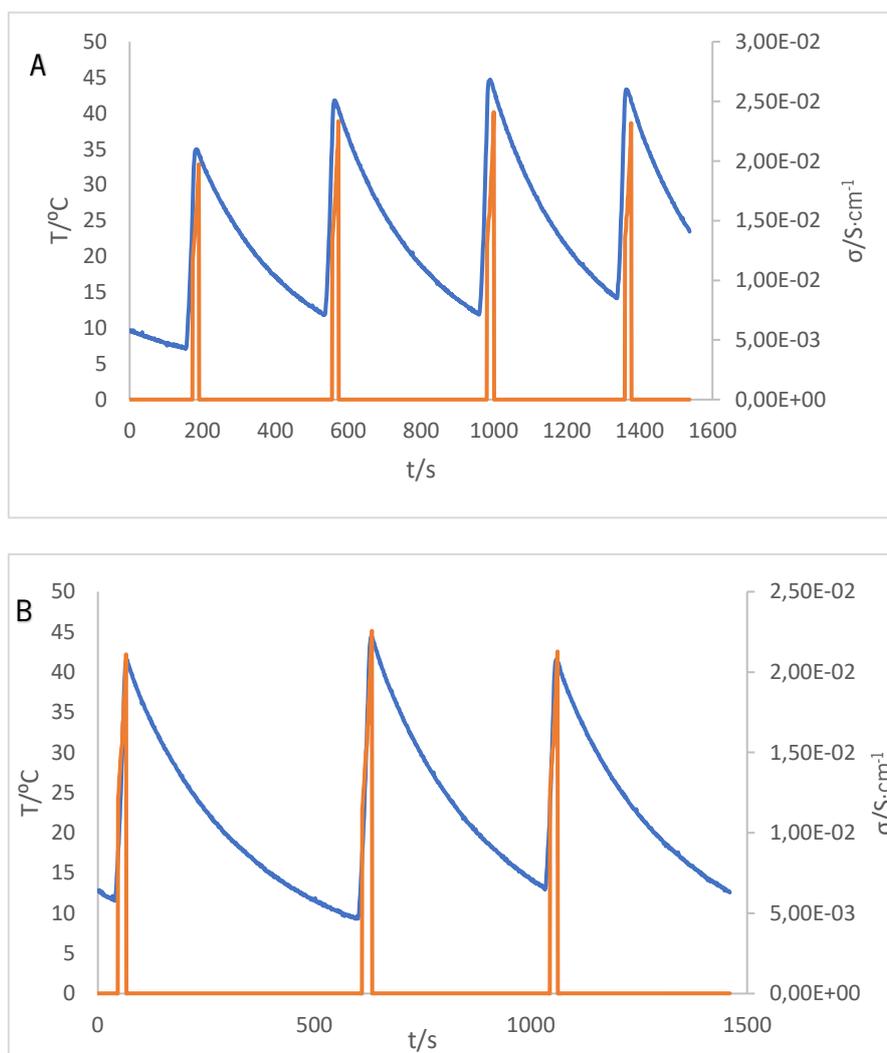
**Figura 59** Variação da temperatura para um tratamento de inóculo de levedura não-lavado com campo elétrico de 90 V/cm, temperatura máxima de 40 °C durante um intervalo de tempo de 20 min.



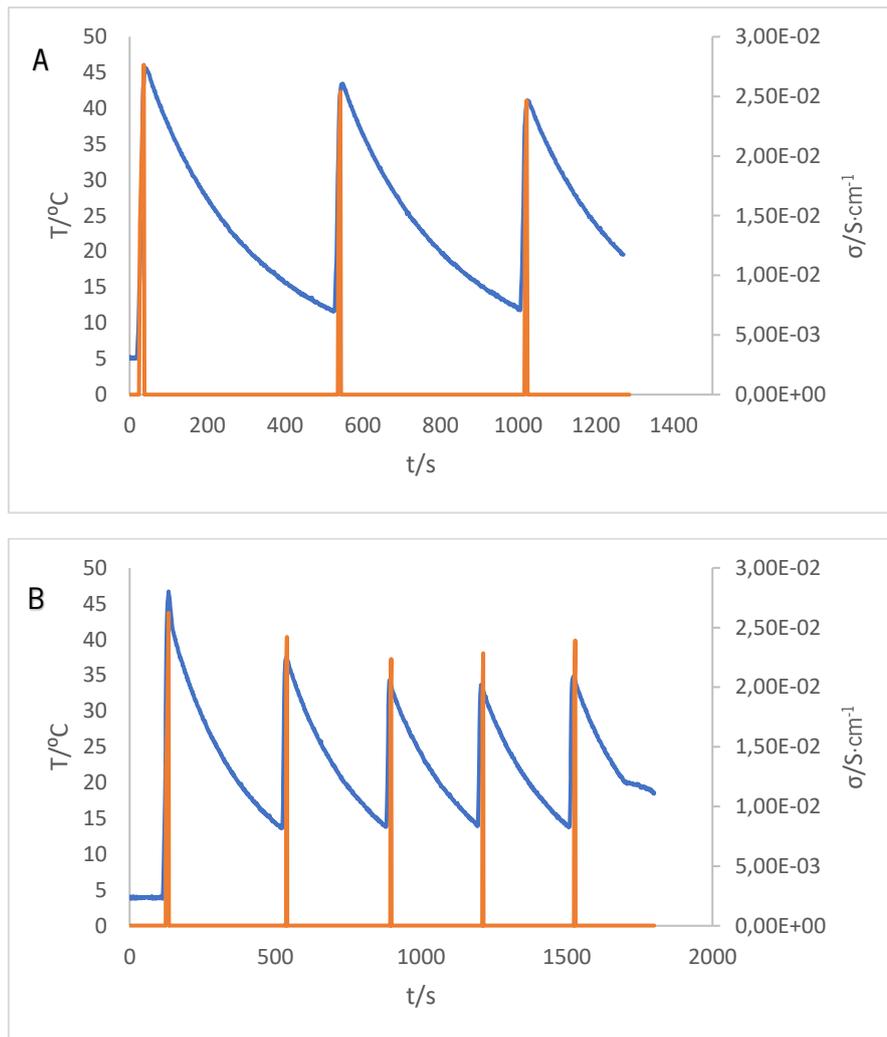
**Figura 60** Variação da temperatura para um tratamento de inóculo de levedura não-lavado com campo elétrico de 90 V/cm, temperatura máxima de 75 °C durante um intervalo de tempo de 20 min.

### Tratamento em Mosto – Protocolo IV

De modo a fazerem-se as caracterizações físico-químicas e microbiológicas do mosto, juntamente com a posterior microvinificação, foram feitos ensaios em mosto de vinho. Nas Figuras 61 e 62 estão expostas as variações de temperatura e condutividade elétrica para cada ensaio.



**Figura 61** Variação da temperatura e da condutividade elétrica para o tratamento do mosto 1 (A) e mosto 2 (B) a um campo elétrico de 50 V/cm e temperatura máxima de 40 °C.



**Figura 62** Variação da temperatura e da condutividade elétrica para o mosto 3 (A) e mosto 4 (B) com um campo elétrico de 75 V/cm e temperatura máxima de 40 °C.

### Caracterização Microbiológica dos Mostos

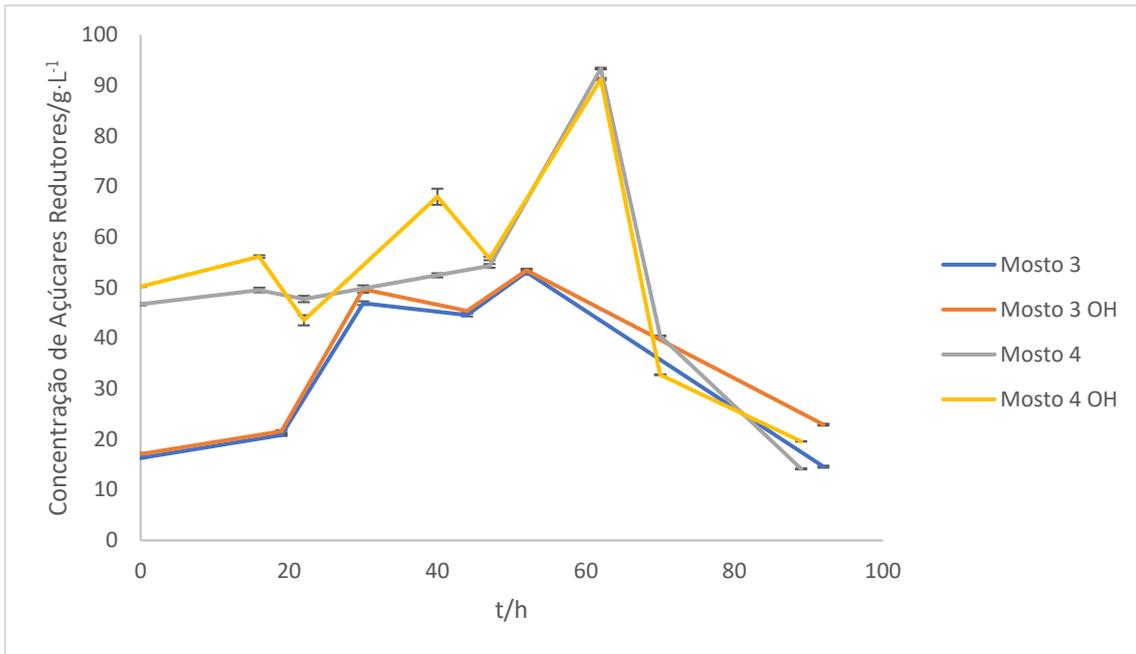
**Tabela 6.** Concentração de açúcares redutores dos vários mostos (quantificada pelo método DNS) sujeitos, ou não, a tratamento óhmico – os caracteres a e b representam diferenças estatísticas entre os valores obtidos

	Concentração de açúcares redutores (g/L)
<b>Mosto 1</b>	33,8220 <sup>a</sup> ± 0,7451
<b>Mosto 2</b>	32,8173 <sup>a</sup> ± 0,4616
<b>Mosto 2 OH</b>	31,7283 <sup>a</sup> ± 1,7229
<b>Mosto 3</b>	49,2541 <sup>b</sup> ± 3,4975
<b>Mosto 3 OH</b>	47,7435 <sup>b</sup> ± 0,8891

A concentração de açúcares redutores do mosto 3 apresenta-se superior tanto para o mosto tratado como para o mosto não-tratado comparativamente aos mostos 1 e 2 (uma vez que os últimos pertencem ao mesmo lote e o mosto 3 pertence a um lote diferente, é plausível os seus conteúdos em açúcares redutores serem distintos).

### **Seguimento da Fermentação Alcoólica**

No que diz respeito à concentração de açúcares redutores dos mostos durante a fermentação, este valor sofreu um aumento que não seria de esperar para todos os casos, aproximadamente às  $t = 20$  h de fermentação. Seria de esperar que a concentração de açúcares redutores diminuísse com o decorrer da fermentação, uma vez que a levedura fermentativa estaria a metabolizá-los em álcool e dióxido de carbono. No final, assiste-se à redução da concentração de açúcares redutores com os mostos a atingirem o fim da fermentação, onde começa a haver escassez de açúcares, sendo que a concentração de açúcares redutores final neste ensaio rondou os 1,5 mg/mL. Uma possível causa que poderá ter levado aos valores inesperados de açúcares redutores é, com a atividade enzimática da levedura fermentativa, açúcares com estruturas maiores poderão ter sido catalisadas em açúcares redutores (como é o caso da sacarose, que é catalisada em glucose e frutose). E uma vez que o método utilizado para a quantificação dos açúcares apenas quantifica açúcares redutores, há a possibilidade de este tipo de polímeros não ter sido quantificado, mas, não obstante, ter estado presente na matriz inicial – sendo depois decompostos em estruturas menores e quantificáveis pelo método, dando origem ao aumento da concentração destes. É possível ver através da Figura 30 que o mosto tratado apresentava sempre uma tonalidade mais escura em comparação ao mosto não-tratado, sendo que a tonalidade de ambos, com o decorrer da fermentação, foi-se tornando cada vez mais clara até serem praticamente indistinguíveis. Sendo o método de DNS um método colorimétrico, a alteração de tonalidade, assim como a própria clarificação do mosto ao longo da fermentação também pode ter tido influência para o padrão observado.



**Figura 63** Variação da concentração de açúcares redutores ao longo do tempo de fermentação em mosto tratado e não-tratado no decorrer de duas microvinificações distintas.