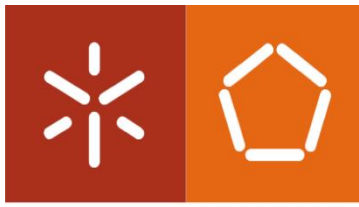


**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

José Carlos Lima da Costa

## **Fermentação do mosto de Vinho Verde – O efeito da ação elétrica na estabilização microbiológica**

janeiro 2022



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

José Carlos Lima da Costa

# **Fermentação do mosto de Vinho Verde – O efeito da ação elétrica na estabilização microbiológica**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Engenharia Química e Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de

**Doutor Ricardo Nuno Correia Pereira**

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

e sob a supervisão na empresa de

**Engenheiro Guilherme Paulo Dias de Castro Pereira**

janeiro 2022

## **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.

## **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**

Uma tese realizada ao longo de tanto tempo, e tempo esse tão único e diferente para todos nós, tem necessariamente de dispensar agradecimentos a muitas individualidades, não tendo espaço para todos, tenho de deixar os mais importantes.

Em primeiro lugar quero agradecer à melhor Academia do país, e a todos com quem me cruzei graças a ela, por ter tido um papel tão fundamental na minha formação académica, mas acima de tudo como homem, por todas as vivências, boas e menos boas, que me possibilitou.

Seguidamente tenho de agradecer aos professores António Vicente e Ricardo Pereira por todo o acompanhamento, disponibilidade e paciência para me orientarem e esclarecerem o que fosse necessário durante todo o trajeto e, nas suas pessoas, agradecer a todos quantos trabalham no Laboratório de Indústria e Processo, que proporcionaram excelentes condições de trabalho.

Da mesma forma, agradecer ao Engenheiro Guilherme Pereira por todo o empenho, entusiasmo e dedicação que me fez estar sempre motivado e pela generosidade em partilhar comigo todo o conhecimento que podia.

Seguidamente agradecer aos meus pais por tudo o que fazem por mim para que eu possa conciliar a minha formação académica com o viver de um sonho desportivo. Sem o seu apoio e compreensão nada disto seria possível.

Agradecer à minha companheira, amiga, confidente e, acima de tudo, motivadora pessoal, a minha namorada. Obrigado, Joana, por tudo aquilo que representaste para mim ao longo destes anos e, fundamentalmente neste último passo, por tanto que lutaste para que eu me mantivesse sempre focado, e por tanto que me ensinas, todos os dias, sobre como ser uma boa pessoa.

Por último, àqueles que, durante largas conversas noturnas, me ajudam a encarar tudo na vida com olhos mais atentos, que me ajudam a ser mais crítico dos tempos que vivemos e, conseqüentemente, me ajudam a ser melhor pessoa: Marta, Barros, Pedro, André e Luís.

# **Fermentação do mosto de Vinho Verde – O efeito da ação elétrica na estabilização microbiológica**

## **Resumo**

Desde há muitos anos que o vinho faz parte do quotidiano das sociedades, ainda que nos primórdios dos hábitos de consumo este se destinasse às suas elites. Ao longo dos tempos, os conhecimentos sobre a produção vinícola foram crescendo. Um tipo de vinho, nacional, com grande relevo interno, mas também no mercado externo é o Vinho Verde. O seu potencial de mercado tem originado o interesse em progredir tecnologicamente na sua produção, de forma a contrariar os problemas que estão associados à mesma, como são exemplos a sazonalidade da colheita das uvas e a adição de sulfurosos para assegurar a estabilidade microbiana do produto final.

O objetivo principal deste trabalho consiste na estabilização microbiológica do Vinho Verde, sem a necessidade de adição de compostos sulfurosos, através da aplicação da tecnologia de aquecimento *óhmico*. Da mesma forma, pretende-se obter fermentações com mesma eficácia e parâmetros cinéticos semelhantes às levadas a cabo sem a utilização desta tecnologia.

O trabalho explorou a utilização de tratamentos elétricos combinados com diversas outras condições experimentais. As condições estudadas, aliadas à aplicação do tratamento elétrico, foram a utilização de um volume inferior, ao normalmente utilizado, de inóculo de levedura adicionada ao mosto, a utilização de um protocolo de tratamento mais rápido daquele que se utilizou em trabalhos anteriores e, ainda, a temperatura a que as fermentações ocorreram.

Foi possível concluir que o tratamento *óhmico* não prejudica a cinética de fermentação e que, todas as variáveis estudadas, acabaram por se mostrar potenciadoras do processo de produção do produto final, quer em termos económicos, quer em termos dos parâmetros de qualidade do mesmo. Obteve-se, assim, um produto final diferenciado, economicamente viável e microbiologicamente estável sem necessidade de adição de compostos sulfurosos.

**Palavras-chave:** aquecimento *óhmico*, fermentação, mosto, Vinho Verde.

# **Fermentation of Vinho Verde must – The effect of temperature in microbiological stability**

## **Abstract**

Wine has been a part of everyday life in society for many years, despite being reserved for the elites when it started being consumed. Over the ages, wine production knowledge grew, practically becoming an art form. A certain type of wine, of national origin, very important nationally but also in foreign markets, is the Vinho Verde. Its market potential has gathered interest in how its production can be technologically enhanced, in order to counter its known production issues, like the seasonality of its harvests, as well as the addition of sulfur compounds to ensure microbiologically stable in the final product.

The main objective of this work is to obtain microbiological stabilization of the Vinho Verde must, without the need to add sulphur compounds, by applying ohmic heating technology. Likewise, it is intended to obtain fermentations with kinetic parameter efficiencies similar to those carried out without the use of this technology.

This work explored the combined use of electrical treatments with other various experimental conditions. The conditions studied, together with the electrical treatment applied, were the use of a lower volume of yeast inoculum added to the must, the use of a faster heat treatment protocol when compared to another one used in previous work, and also to evaluate the temperature at which the fermentations took place.

It was possible to conclude that the ohmic treatment does not harm the fermentation kinetics and that all the variables studied proved to be enhancers of the production process of the final product, both in economic terms and in terms of its quality parameters. Thus, a differentiated, economically viable and microbiologically stable final product was obtained without the need to add sulphur compounds.

**Keywords:** *fermentations, must, ohmic heating, Vinho Verde*

# Índice

Agradecimentos .....	iii
Fermentação do mosto de Vinho Verde – O efeito da ação elétrica na estabilização microbiológica .....	iv
Fermentation of Vinho Verde must – The effect of temperature in microbiological stability .....	v
Índice de Figuras .....	viii
Índice de Tabelas .....	x
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos .....	xi
1. Introdução .....	1
1.1. Motivação e objetivos .....	1
1.2. Organização da Dissertação .....	2
2. Fundamentação Teórica .....	3
2.1. Vinho .....	3
2.2. Vinho Verde e a Região Demarcada .....	4
2.2.1. Viticultura .....	6
2.2.2. Vinificação .....	8
2.3. Fermentação Alcoólica .....	11
2.3.1. Microflora presente no mosto .....	12
2.3.2. Propriedades físico-químicas do mosto .....	15
2.3.3. Outros fatores que influenciam a fermentação .....	16
2.3.4. Temperatura de fermentação .....	17
2.3.5. Perfil organoléptico .....	18
2.4. Adição de dióxido de enxofre .....	20
2.4.1. Tratamento com compostos sulfurosos .....	20
2.4.2. Estratégias alternativas ao tratamento .....	21
2.5. Processamento por campos elétricos .....	22
2.5.1. Campos elétricos induzidos por pulsos ( <i>Pulsed electric fields – PEF</i> ) .....	22
2.5.2. Campos elétricos moderados ( <i>Moderate electric fields – MEF</i> ) .....	24
2.5.3. Aquecimento Óhmico (OH) .....	24
3. Materiais e Métodos .....	28
3.1. Preparação do mosto .....	28
3.2. Caracterização física e química do mosto .....	28
3.3. OH aplicado ao mosto .....	30
3.4. Condições de fermentação .....	32

3.5.	Codificação dos mostos.....	33
3.6.	Caracterização física e química do vinho final .....	35
4.	Resultados e Discussão .....	36
4.1.	Caracterização física e química do mosto .....	36
4.2.	Variabilidade da amostra .....	37
4.3.	Otimização do inóculo.....	39
4.4.	Efeito dos tratamentos óhmicos na cinética de fermentação .....	40
4.5.	Comparação entre os dois tratamentos utilizados .....	43
4.6.	Comparação entre diferentes temperaturas de fermentação .....	47
4.7.	Caracterização física e química do vinho final .....	49
4.8.	Análise de estabilidade sem adição de sulfurosos.....	50
5.	Conclusão .....	53
	Bibliografia .....	54
	Anexos.....	58
	Anexo I.....	58
	Anexo II.....	59
	Anexo III.....	60
	Anexo IV .....	61



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Região Demarcada dos Vinhos Verdes (adaptado de Centro de Interpretação e Promoção do Vinho Verde).....	4
<b>Figura 2.</b> Principais castas brancas (Alvarinho, Arinto, Loureiro e Trajadura).....	5
<b>Figura 3.</b> Principais castas tintas (Espadeiro, Padeiro e Vinhão) .....	5
<b>Figura 4.</b> Esquema das principais etapas de vinificação de vinhos brancos (a verde) e tintos (a roxo).....	9
<b>Figura 5.</b> Selo de Garantia da CVRVV para Vinhos Verdes. ....	11
<b>Figura 6.</b> Esquema da fermentação alcoólica. ....	12
<b>Figura 7.</b> Reator (com refrigeração) utilizado para os diversos tratamentos.....	31
<b>Figura 8.</b> Instalação para acompanhamento da fermentação de dois mostos: à esquerda uma amostra de controlo e à direita uma amostra sujeita a tratamento Óhmico 1. ....	32
<b>Figura 9.</b> Régua de medição do TAV .....	35
<b>Figura 10.</b> Gráfico representativo do perfil de evolução da concentração de AR ao longo do tempo de vários mostos, os quais estão descritos na legenda (códigos apresentados na Tabela 3). ....	37
<b>Figura 11.</b> Limites dentro dos quais os perfis de evolução da concentração de AR das várias fermentações se devem encontrar. ....	38
<b>Figura 12.</b> Evolução da concentração de AR em fermentações do mesmo mosto sujeito a três tratamentos diferentes. No gráfico estão representados os dados relativos ao Controlo (CN622), ao tratamento Óhmico 1 (CP622) e ao tratamento Óhmico 2 (CO622) representados, respetivamente, pelas cores azul, laranja e cinzento.....	42
<b>Figura 13.</b> Evolução da concentração de AR ao longo de duas fermentações, sujeitas a temperatura ambiente. O tratamento Óhmico 1 é representado pelas linhas azul e amarela enquanto o tratamento Óhmico 2 é representado pelas linhas laranja e verde. ....	44
<b>Figura 14.</b> Evolução da concentração de AR durante duas fermentações sujeitas a temperatura ambiente (gráfico A) e temperatura controlada (gráfico B), cujo mosto de origem provém do mesmo lote. Estão representados a azul o Controlo, a laranja o tratamento Óhmico 1 e a cinzento o tratamento Óhmico 2.....	45
<b>Figura 15.</b> Perfis de concentração de AR ao longo de várias fermentações sob temperatura controlada.....	48

<b>Figura 16.</b> Aspeto do mosto ao fim de uma semana; A representa o mosto sujeito aos vários tratamentos e B representa o mosto não tratado.....	51
<b>Figura 17.</b> Perfis de concentração de AR ao longo das fermentações com mostos sujeitos ao protocolo de tratamento de estabilidade.....	51

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Principais castas recomendadas para cada sub-região da Região Demarcada dos Vinhos Verdes.....	5
<b>Tabela 2</b> - Descrição das condições dos dois tratamentos utilizados .....	31
<b>Tabela 3</b> - Codificação dos vários mostos tratados e fermentados.....	34
<b>Tabela 4</b> - Caracterização dos mostos utilizados.....	36
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros cinéticos médios de fermentações sujeitas a Inoculação 1 e com mosto não tratado e de duas fermentações sujeitas a Inoculação 2 .....	39
<b>Tabela 6</b> - Comparação de parâmetros cinéticos médios da Inoculação 1 e 2.....	40
<b>Tabela 7</b> - Valores de produtividade e eficiência de fermentação.....	42
<b>Tabela 8</b> - Comparação dos parâmetros cinéticos médios de mostos sujeitos aos dois tratamentos e fermentados a temperatura ambiente .....	44
<b>Tabela 9</b> – Média das velocidades de fermentação de cada tratamento obtidas através do valor absoluto da taxa de consumo de AR.....	46
<b>Tabela 10</b> - Comparação dos parâmetros cinéticos médios de fermentações a temperatura ambiente e controlada .....	47
<b>Tabela 11</b> - Caracterização final dos vinhos obtidos através das fermentações levadas a cabo sob as "condições ideais" .....	49
<b>Tabela 12</b> - Parâmetros cinéticos de todos os mostos analisados .....	58
<b>Tabela 13</b> - Médias, desvios padrão e teste estatístico para otimização do inóculo.....	59
<b>Tabela 14</b> - Médias, desvios padrão e teste estatístico para comparação entre tratamentos...	60
<b>Tabela 15</b> - Médias, desvios padrão e teste estatístico para comparação entre temperaturas de fermentação .....	61

## **Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos**

AR – Açúcares redutores

AT – Acidez total

AV – Acidez volátil

BAA – Bactérias produtoras de ácido acético

BAL – Bactérias ácidas lácticas

CVRVV – Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DO – Denominação de Origem

IVV – Instituto da Vinha e do Vinho

MEF – Campos elétricos moderados

OH – Aquecimento óhmico

PEF – Campos elétricos com pulsos de curta duração

TAV – Título alcoométrico volúmico

T – Temperatura

V – Tensão da corrente elétrica

# **1. Introdução**

## **1.1. Motivação e objetivos**

O vinho é um produto que acompanha a sociedade há vários séculos. Nos seus primórdios era visto como um sinal de estatuto social, uma vez que só estava ao acesso das elites, mas com a difusão do mesmo por toda a Europa, em grande parte devido ao crescimento do Império Romano, tornou-se um elemento civilizador. Os conhecimentos sobre a sua produção foram aumentando e, por isso, a sua produção também, possibilitando que se tornasse num produto abrangente e acessível a todas as classes da sociedade.

O desenvolvimento tecnológico foi muito importante para que para além da quantidade fosse possível obter vinhos com cada vez maior qualidade. Estes fatores, associados a um desenvolvimento social e de hábitos de consumo, fez com que nos dias que correm, o vinho seja visto como um produto que acompanha o convívio social, como sempre foi, mas que é consumido de forma diferente. A procura mantém-se muito elevada, mas não se reflete num consumo desmedido, o consumidor, no geral, consome em quantidades mais reduzidas, mas procura mais qualidade.

Atualmente um dos tipos de vinho com maior potencial de mercado a nível nacional e internacional é o Vinho Verde, originário de uma das Regiões Demarcadas mais antigas do Mundo. Os produtores têm procurado maneiras de continuarem a aumentar a qualidade deste vinho, mas encontram diversos problemas no processo, seja na fase da viticultura ou da vinificação. Entre estes problemas destacam-se a sazonalidade da colheita das uvas, na parte da viticultura, o que obriga a grande azáfama durante um curto período, e em que, por vezes, não é possível produzir o vinho com todo o cuidado, uma vez que é preciso utilizar rapidamente o mosto fresco que chega às adegas. Outro dos problemas, associado à vinificação, é a necessidade de acrescentar compostos sulfurosos no produto final para assegurar a sua estabilidade microbiana, o que influi negativamente sobre as propriedades organolépticas do vinho, e são considerados produtos tóxicos e alergénicos, prejudicando a qualidade do produto final.

Posto isto, o trabalho que se realizou teve como objetivo principal colmatar o problema da adição de sulfurosos usando um tratamento prévio à fermentação – aquecimento óhmico. Apesar deste ser o principal objetivo, acredita-se que o método possa ter influência também no problema da necessidade de utilizar rapidamente o mosto. Utilizando os princípios da influência de campos elétricos sobre a microflora do mosto, tentou-se desenvolver um tratamento que, por um lado, permita inativar a atividade

microbiana do mosto e, por outro lado, que permita a sua fermentação ocorrer de forma natural sem necessidade de adição de compostos sulfurosos, bem como a sua remoção posterior, obtendo assim mais qualidade do produto final. Da mesma forma, procurou-se utilizar o mesmo tratamento para assegurar a estabilidade do mosto antes de proceder à inoculação precedente à fermentação, para que este possa ser armazenado a temperatura ambiente sem prejudicar a sua capacidade fermentativa, dando deste modo tempo aos produtores para encararem esta fase de grande trabalho com mais tranquilidade e permitindo que, mosto que por vezes se torna inutilizável, possa ser aproveitado.

Se for possível obter resultados condizentes com as expectativas iniciais, poderemos obter produtos de maior qualidade e dar aos produtores ferramentas para tratarem e produzirem o vinho de forma cuidada, respeitando ao máximo as necessidades e exigências dos consumidores, permitindo assim maiores lucros empresariais à indústria.

## **1.2. Organização da Dissertação**

A presente dissertação está organizada em seis partes distintas. A primeira das quais a introdução onde é descrita a motivação inicial para o desenvolvimento do trabalho bem como a descrição dos seus objetivos.

Segue-se uma parte de fundamentação teórica onde serão abordados conceitos essenciais para a realização do trabalho tais como a apresentação da indústria vitivinícola do Vinho Verde, bem como uma descrição deste produto e as suas origens, as características da microflora do mosto que se pretende tratar, os princípios associados ao tratamento a aplicar ao mosto, conceitos teóricos do processo fermentativo e a utilização de dióxido de enxofre.

Na terceira parte explica-se o processo de desenvolvimento do trabalho, a parceria e a divisão de tarefas realizadas entre a empresa de acolhimento e o Laboratório de Indústria e Processos (no CEB-UMinho), os protocolos utilizados tanto nos tratamentos como nas fermentações e, por fim, serão também apresentadas algumas variabilidades nesses mesmos protocolos onde se pretendeu inferir a influência de alguns parâmetros nos resultados.

Na parte seguinte apresentam-se todos os resultados obtidos assim como a discussão dos mesmos.

Na última parte apresentam-se as conclusões do trabalho realizado e algumas considerações sobre eventuais trabalhos futuros.

## 2. Fundamentação Teórica

### 2.1. Vinho

Apesar da sua origem ser incerta sabe-se que este produto faz parte da vida, cultura e dieta europeias desde tempos imemoriais. A produção e consumo na Europa ganhou grande relevância aquando da expansão do Império Romano pelo Mediterrâneo, quando muitas das principais regiões de produção, ainda hoje existentes, foram estabelecidas (Wine in Moderation, 2020).

No processo de civilização, o vinho acaba por se tornar um agente civilizador e passou de algo que era apenas acessível às elites e aos deuses, a remédio poderoso e finalmente a instrumento de sociabilidade, fonte de prazer e vício, símbolo de *status*, mas também de degradação.

Para além da grande importância como agente civilizador foi um grande impulsionador da economia de todos os estados e em várias áreas, não só pela produção, que é muito instável, mas também por obrigar a um desenvolvimento de vários setores artesanais, transporte, comércio, entre outros (Guarinello, 1997).

Ao longo dos tempos, os conhecimentos foram aprofundados e a produção de vinho foi tornando-se quase numa arte. Durante o século XVI, com a diversificação da produção e da qualidade, os consumidores começaram a variar os seus hábitos de consumo. Para além dos aspetos evolutivos tecnológicos relacionados com a produção e a obtenção de melhores qualidades, este desenvolvimento da indústria permitiu torná-la capaz de responder a uma procura cada vez maior sem perder as características individuais de cada vinho. Essa procura não se reflete num consumo desmedido, bem pelo contrário, os consumidores preferem um consumo mais reduzido, mas com mais qualidade fazendo, atualmente, parte de um estilo de vida moderno e saudável (Wine in Moderation, 2020).

Por definição o vinho é um produto obtido exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas ou mostos de uvas frescas que apresenta, na região na qual Portugal se encontra, um título alcoométrico volúmico (TAV) compreendido entre os 9 % e os 15 %, sendo proveniente de castas de uva classificadas para a produção de vinho (IVV, 2020).

O Vinho Verde é um produto originário da Região Demarcada dos Vinhos Verdes no noroeste de Portugal, uma das regiões vitivinícolas mais antigas do mundo que movimenta milhares de produtores, numa atividade económica geradora de riqueza e postos de trabalho, contribuindo solidamente para o desenvolvimento do Minho e do país (CVRVV, 2021).

## 2.2. Vinho Verde e a Região Demarcada

No noroeste de Portugal continental encontra-se, como já foi referido, uma das mais antigas Regiões Demarcadas do mundo, demarcação essa que remonta à data de 18 de setembro de 1908. Numa zona tradicionalmente conhecida como Entre-Douro-e-Minho, encontramos a Região Demarcada dos Vinhos Verdes, região essa com condições naturais ideais para a produção de excelentes vinhos brancos. A influência que o atlântico tem sobre a região, os solos de origem maioritariamente granítica, o clima ameno e a elevada precipitação traduzem-se na frescura, leveza e elegância tão próprias destes vinhos (CVRVV, 2021).



**Figura 1.** Região Demarcada dos Vinhos Verdes (adaptado de Centro de Interpretação e Promoção do Vinho Verde).

No entanto, existem variações relativas aos solos e aos microclimas da região que permitem estabelecer nove sub-regiões, para as quais existem diferentes castas recomendadas. Como tal, sabe-se também que existem diferentes variedades de castas entre aquelas que originam os vinhos brancos e os vinhos tintos, entre as quais se destacam as Alvarinho, Arinto, Loureiro e Trajadura nas brancas enquanto



nas tintas se destacam a Espadeiro, a Padeiro e Vinhão. Todas elas estão representadas nas Figuras 2 e 3 (CVRW, 2021).



**Figura 2.** Principais castas brancas (Alvarinho, Arinto, Loureiro e Trajadura)



**Figura 3.** Principais castas tintas (Espadeiro, Padeiro e Vinhão)

Na tabela seguinte encontram-se discriminadas as castas brancas (a verde) e tintas (a roxo) que são aconselháveis para cada sub-região, privilegiando a maturação das uvas e a qualidade do vinho.

**Tabela 1** – Principais castas recomendadas para cada sub-região da Região Demarcada dos Vinhos Verdes.

Castas	Sub-Região								
	Monção e Melgaço	Lima	Cávado	Basto	Amarante	Baião	Sousa	Paiva	Ave
Alvarinho	✓								
Arinto		✓	✓				✓	✓	✓
Avesso					✓	✓	✓	✓	
Azal				✓	✓	✓	✓		
Loureiro			✓				✓	✓	✓
Trajadura		✓	✓				✓	✓	
Alvarelhão	✓								
Amaral					✓	✓		✓	
Borraçal		✓	✓				✓		
Espadeiro				✓	✓				
Padeiro									
Pedral									
Rabo de Anho				✓					
Vinhão		✓	✓				✓	✓	

Cada casta e cada região apresentam características muito próprias, que depois se refletem em vinhos, também eles, muito singulares. Tendo em conta os mostos utilizados ao longo do trabalho, importa deixar claro as propriedades fundamentais da sub-região do Cávado, bem como dos vinhos produzidos na mesma. Nesta sub-região a vinha está distribuída um pouco por toda a bacia hidrográfica do rio que lhe dá nome, estando bastante exposta a ventos marítimos numa zona de relevo irregular e baixa altitude, características que proporcionam um clima ameno com uma pluviosidade média anual intermédia. Além dos solos graníticos, existe uma faixa, não muito abrangente, de solos xistosos. Este clima é propício à produção de vinhos brancos, principalmente originários das castas Arinto, Loureiro e Trajadura, como indicado na tabela, que se adaptam perfeitamente a estas condições. Estes vinhos são caracterizados pelas notas de frutos citrinos e pomóideas, bem como pela sua acidez moderada. Já os vinhos tintos, essencialmente provenientes de lotes de Borraçal e Vinhão, apresentam uma cor vermelha intensa contendo aromas a frutos frescos e evidenciam, no paladar, toda a frescura climática da sub-região onde são produzidos (CVRV, 2021).

Como já foi referido, o Vinho Verde tem características muito singulares e que são fundamentais para que a Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRV), a quem compete a certificação do produto como tendo o direito ao uso da Denominação de Origem (DO), bem como a sua genuinidade e qualidade (CVRV, 2005). Esta comissão estabelece que estes produtos víquicos devem revelar características organoléticas associadas ao aspeto visual (limpidez e cor), olfativo (aroma) e gustativo (sabor). Todos estes parâmetros são avaliados pela Câmara dos Provedores que se pronuncia sobre as amostras que são enviadas para apreciação por parte da CVRV (CVRV, 2005).

### **2.2.1. Viticultura**

A mesma Comissão dispõe o regulamento que especifica as características que devem ser tidas em conta na primeira fase de produção dos vinhos verdes, a viticultura. Esta regulamentação indica as intervenções que devem ser efetuadas nos solos e na vinha, entre outros. É então definido que as vinhas destinadas à produção de vinhos ou produtos vitivinícolas com DO «Vinho Verde» e, mais concretamente, com indicação da sub-região, neste caso do Cávado, devem estar ou ser instaladas em solos litólicos húmicos provenientes de rochas eruptivas (granitos) ou em solos metamórficos (xistos e gneisses) ou em depósitos areno-pelíticos (CVRV, 2015).

Atualmente, após a seleção da casta que se pretende cultivar, e do solo onde se irá proceder ao cultivo, é utilizada uma técnica conhecida como enxertia. Esta é utilizada para contornar a sensibilidade das castas europeias à picada do inseto. Perante isto passou-se a usar o porta-enxerto como uma ponte

entre a casta e o solo. A exploração do solo é então feita pelo sistema radicular de uma videira americana (porta-enxerto) e a exploração da parte aérea ocorre através da casta que irá ser a produtora das uvas. A escolha da variedade do porta-enxerto depende da sua adaptação às características do solo (acidez, secura, etc.) e da sua afinidade com a casta. O recurso à técnica de enxertia no novo solo deve ser feita durante o período de repouso vegetativo (CVRVV, 2021).

A partir daqui e verificando-se o crescimento das plantas devem existir cuidados a tomar ao longo do tempo como são caso a manutenção das características do solo, a poda, as intervenções em verde, que são um conjunto de operações efetuadas à videira durante o ciclo vegetativo, com o objetivo de proporcionar as melhores condições de crescimento e maturação dos cachos, e ainda a aplicação de tratamentos fitossanitários com o propósito de combater as pragas, uma vez que a Região dos Vinhos Verde, em consequência das condições ambientais - clima com muita humidade ambiental durante grande parte do ciclo vegetativo da videira conjugado com temperaturas favoráveis - é particularmente propícia ao desenvolvimento de uma grande pressão de doenças e pragas na cultura da vinha (CVRVV, 2021) (Jackson, 2008).

Segundo o Regulamento da Produção e Comércio da DO Vinho Verde, Artigo 9º, os métodos e práticas de vinificação devem ser os mais adequados à obtenção de vinhos de qualidade, bem como o rendimento em mosto que resulta da separação dos bagaços não pode ser superior a 75 L por 100 Kg de uvas, exceto para os mostos destinados à produção dos vinhos com direito à utilização na rotulagem da casta Alvarinho, cujo rendimento máximo é fixado em 65 L por 100 Kg de uvas (CVRVV, 2015).

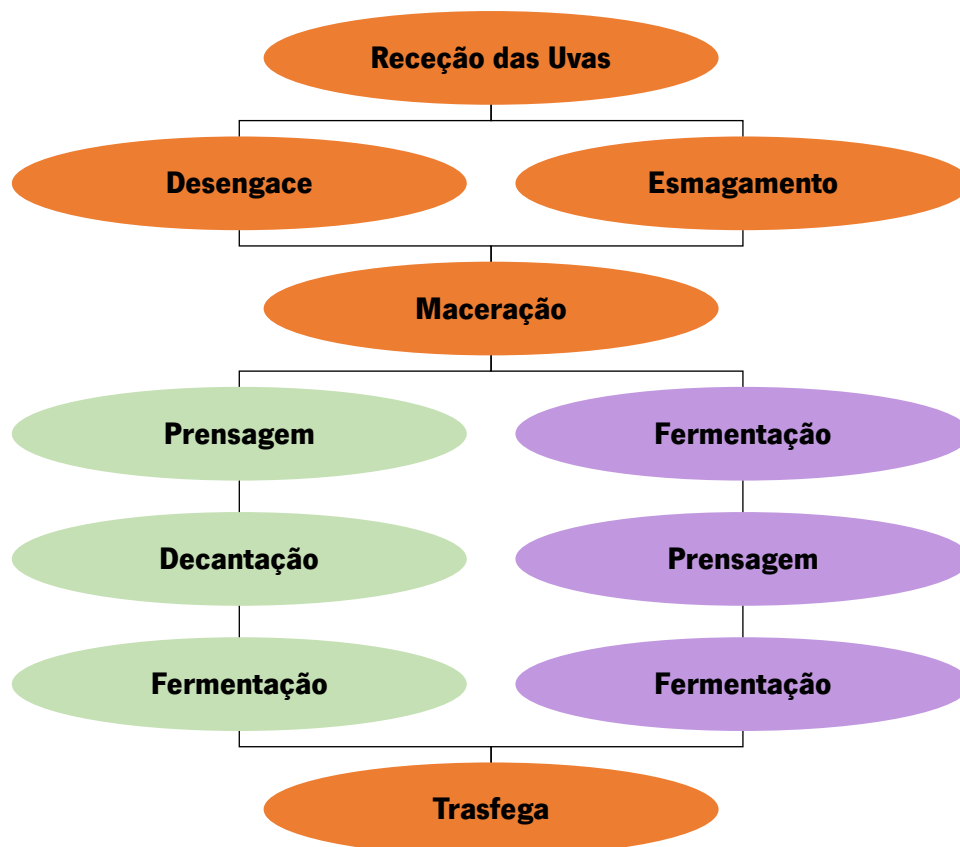
Para otimizar a vindima devem acontecer alguns preparativos antes desta ocorrer. É importante que haja um acesso à vinha por tratores que permitam a limpeza atempada da entrelinha para a livre circulação dos mesmos. Deve ocorrer um acompanhamento rigoroso da maturação das uvas, observando a evolução na coloração das uvas que se verificam devido às alterações nas propriedades químicas do fruto – o tanino e os ácidos diminuem dando lugar ao crescimento de concentração de açúcares, matéria corante e compostos aromáticos – até se atingir um ponto de equilíbrio que deve coincidir com a vindima. A avaliação que define o momento ideal da vindima pode ocorrer através de métodos subjetivos baseados na observação da coloração das uvas, no sabor açucarado das mesmas, na facilidade com que o cacho se desprende da videira, ou pode ocorrer com base em métodos rigorosos que estabelecem o estado de evolução da maturação através da análise da concentração de açúcares e

diminuição da acidez total do mosto, que estabilizam ao mesmo tempo que se atinge o máximo do peso dos bagos (CVRVW, 2021).

Avaliado o estado de maturação e verificando as uvas que se encontram no ponto de equilíbrio deve proceder-se à colheita das uvas, evitando a recolha de uvas podres. A colheita deve ser efetuada com recurso a instrumentos próprios, como tesouras, que permitem um trabalho rápido e eficaz. Ao longo deste processo deve evitar-se a rutura da película do bago de forma a evitar perdas de mosto, mas também para prevenir possíveis infeções. A última etapa da vindima é o transporte das uvas para as adegas. Este deve ser feito em caixas pequenas, deve ocorrer o mais rápido possível evitando-se uma exposição demasiado longa ao sol ou que haja chuva a cair no recipiente de transporte (CVRVW, 2021).

### 2.2.2. Vinificação

A etapa de vinificação começa aquando da receção das uvas na adega ou lagar. A partir daqui as uvas percorrem uma série de etapas das quais se destacam a receção das uvas, a prensagem, a fermentação e o engarrafamento, que como é possível ver no esquema da Figura 4. se desenvolvem em diferentes alturas no processamento de vinhos brancos e tintos.



**Figura 4.** Esquema das principais etapas de vinificação de vinhos brancos (a verde) e tintos (a roxo).

Após a receção das uvas procede-se ao esmagamento das mesmas com ou sem desengace, que consiste na separação das uvas dos restantes constituintes da videira, este permite remover compostos fenólicos do produto final, no entanto, estes são produtos com especial interesse no caso da produção de vinhos tintos. De produtor para produtor vemos diferentes opções quanto à aplicação desta etapa no processamento uma vez que a presença ou ausência destes compostos dá ao vinho características diferentes. Após este processo, deve ser efetuado, o mais rapidamente possível, o esmagamento das uvas para libertar a polpa da mesma. Neste momento deve haver um especial cuidado para que as grainhas das uvas não sejam esmagadas sob risco de que, os óleos nelas contidos, contaminem o mosto (Jackson, 2008).

Para além do desengace e do esmagamento, os produtores podem optar por efetuar uma fase de maceração. Um período longo de maceração originará vinhos com uma estrutura melhorada, uma maior intensidade corante, um índice de polifenóis mais elevado e uma componente aromática mais intensa, enquanto um período mais curto irá refletir-se num vinho fresco e frutado. De uma forma sucinta, este é um processo que consiste em sujeitar o mosto a um contacto com película da uva permitindo que este ganhe novas características. Esta técnica é mais utilizada na produção de vinhos tintos do que em vinhos brancos, no entanto a utilização da mesma está a crescer também nos últimos, com os enólogos a procurarem dar novos sabores e sensações aos consumidores (CVRVV, 2021) (Jackson, 2008).

As fases já descritas do processo de vinificação são semelhantes para os vinhos brancos e tintos, no entanto, daqui para a frente existe uma diferença relevante na sua produção. Enquanto os vinhos tintos sofrem a maceração e seguem para fermentação, os vinhos brancos seguem para uma fase de prensagem que precede a fermentação. Concentrando a atenção do trabalho sobre a produção de mostos de vinho verde branco, é importante abordar a fase de prensagem. Esta consiste, tal como o nome diz, em sujeitar o mosto a uma pressão exercida de forma mecânica que pode acontecer através de vários equipamentos como a prensa vertical, a horizontal, entre outras. Consoante o nível de prensagem que se obtém o mosto irá variar, proporcionalmente, por exemplo, na turbidez e na concentração de compostos fenólicos enquanto irá variar de forma inversamente proporcional na acidez (Jackson, 2008).

Antes ainda da fermentação o mosto é sujeito a uma decantação que tem como objetivo a sua clarificação que, por sua vez, pretende, com a diminuição da matéria suspensa, uma inibição dos

processos de oxidação induzidos por algumas enzimas. Contudo é fundamental haver um cuidado com esta fase para evitar um excesso de clarificação que pode levar a uma diminuição da velocidade de fermentação, devido à remoção de compostos fundamentais à ocorrência da mesma que arriscam a viabilidade de leveduras alvo, devido à eliminação de nutrientes essenciais à sua reprodução e crescimento, e, por fim, originar uma produção excessiva de ácido acético durante o processo fermentativo (Jackson, 2008).

Após estes tratamentos dá-se então início à fermentação do mosto. A fermentação alcoólica é um processo metabólico natural dos microrganismos na ausência de oxigénio, no caso concreto da fermentação alcoólica a glucose e a frutose são consumidas originando etanol no final do processo, transformando o mosto no produto alcoólico que é conhecido (Jackson, 2008). Sendo um processo que foi alvo de estudo neste trabalho, mais à frente será alvo de fundamentação teórica mais detalhada.

Estamos perante as últimas etapas de produção, mas ainda antes do engarrafamento ocorre nova trasfega para remover qualquer resíduo resultante da fermentação. É nesta fase que são adicionados compostos sulfurosos, algo que será abordado mais profundamente no seguimento do presente trabalho, que pretendem evitar novas fermentações e manter a estabilidade microbiana do vinho. O vinho é, então, deixado a maturar em cubas de inox ou madeira. As cubas de madeira proporcionam ao vinho aromas mais amadeirados, conferindo-lhe o amadurecimento dos seus taninos, proporcionando mais estrutura, intensificação da cor, aromas de baunilha, especiarias e canela, deixando o vinho também mais exposto ao oxigénio que passa por entre as porosidades da madeira. A maturação em cubas de inox permite aos vinhos manterem a sua frescura e os seus aromas frutados, resultando em vinhos mais jovens e leves. A escolha entre as condições de maturação do vinho depende das características que o enólogo pretender incorporar no mesmo (Jackson, 2008) (Horsey, 2007) (Garcia, 2019).

Finalmente, após todos estes processos, efetua-se o engarrafamento. O vinho fica, então, em repouso na adega por tempo a definir pelo enólogo esperando pelos últimos ajustes das propriedades naturais do vinho como são o desenvolvimento da cor, aromas e sabores que evoluem ao longo do tempo (Jackson, 2008) (Garcia, 2019).

A última etapa, antes da comercialização, é a certificação e rotulagem por parte da CVRVV, que avalia ainda todos os parâmetros físico-químicos do produto final, assegurando a qualidade do vinho através do selo de garantia em vigor desde 2012 que se encontra na Figura 5.



**Figura 5.** Selo de Garantia da CVRVV para Vinhos Verdes.

As características físico-químicas do produto são descritas pela CVRVV e, uma das primeiras é o TAV total do vinho que deve ser igual ou superior a 8,5 % vol. e máximo igual ou inferior a 14 % vol. para vinhos brancos, tintos e rosados, o TAV adquirido deve estar compreendido entre 8 % e 11,5 % com exceção dos vinhos com indicação de casta, sub-região e ou que usufruam de um designativo de qualidade como são exemplos «Reserva», «Reserva Especial» e «Grande Reserva». É ainda descrito que o TAV adquirido mínimo para os vinhos com indicação de Sub-Região de 9 % vol. e nos vinhos com direito à utilização da casta Alvarinho de 11,5 % vol.

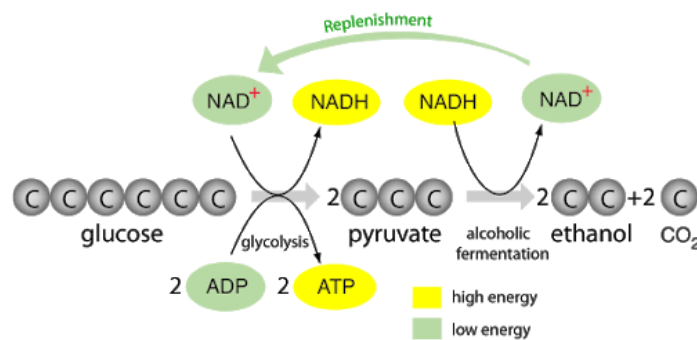
Outro tipo de características definidas pela CVRVV são a acidez fixa, expressa em ácido tartárico, igual ou superior a 4,5 g/L e a sobrepresão em dióxido de carbono máxima de 1 kPa, a 20 °C, ou concentração inferior ou igual a 3 g/L.

Do ponto de vista organolético, os vinhos objeto da presente portaria devem satisfazer os requisitos apropriados quanto à cor, limpidez, aroma e sabor, nos termos a definir pela entidade certificadora, neste caso a comissão já referida. Por fim, os vinhos que após a certificação e rotulagem possam apresentar depósito só podem ser comercializados com indicação de «Sujeito a Depósito» ou menção equivalente no rótulo (CVRVW, 2015).

### **2.3. Fermentação Alcoólica**

A fermentação é um processo de obtenção de energia utilizado, na ausência de oxigénio molecular, sendo que no caso específico da fermentação alcoólica é levado a cabo por bactérias e leveduras que, utilizam como substrato os açúcares presentes no mosto, originando a produção de etanol, processo sucintamente representado na Figura 6. Esta etapa é fundamental na produção do vinho. Pode realizar-se através de espécies de bactérias e leveduras já presentes no mosto ou através de

espécies comercializadas e usadas especificamente para este processo. Uma das espécies mais utilizadas para este tipo de fermentação são as *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que é das espécies mais capazes de suportar as condições adversas que o mosto apresenta e de as ultrapassar durante o processo fermentativo (Ferreira, 2004). É comum observar que um dos problemas das fermentações são o consumo lento e incompleto dos açúcares disponíveis, o que leva os enólogos a considerarem as fermentações como completas quando os açúcares concentrados apresentam valores inferiores a 5 g/L, ainda que, os valores mais normais atingidos, sejam inferiores a 2 g/L (Ferreira, 2004).



**Figura 6.** Esquema da fermentação alcoólica.

O foco do presente trabalho é sobre a capacidade fermentativa do mosto após um tratamento elétrico, o OH. Importa, por isso, descrever alguns dos fatores que influenciam a cinética da fermentação alcoólica, sendo que um dos principais temas discutidos será a velocidade da mesma. Apesar de não ser desejável que as fermentações sejam lentas, pois podem originar diversos problemas, sabe-se que, por outro lado, uma fermentação rápida não permite que o vinho consiga desenvolver todo o seu potencial organoléptico, como irá ser explicado mais à frente (Ferreira, 2004).

### **2.3.1. Microflora presente no mosto**

A microflora natural do mosto irá influenciar o desenvolvimento da fermentação. Existe uma grande variedade de microrganismos, entre os quais leveduras, bactérias e fungos que importa perceber como afetam o passo tão importante que trata este tópico. Após o início da fermentação alcoólica, as leveduras assumem um papel fundamental no processo (Ferreira, 2004) (Pinto *et al.*, 2015).

Apesar de a *S. cerevisiae* ser a espécie que se usa, em maior escala, para proceder à fermentação, esta raramente se encontra presente no mosto sem algum tipo de competição. Na verdade, as espécies de leveduras selvagens são as que mais se encontram no mosto, com preponderância de umas sobre as outras dependendo do meio ambiente em que se encontram as uvas. No mosto



encontram-se, então, predominantemente, espécies dos géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Metchnikowia*, *Candida*, *Pichia*, entre outras que irão sobreviver até ao momento em que a concentração de etanol atinge um valor intolerável para as mesmas e que propicia o desenvolvimento da *S. cerevisiae* (Ferreira, 2004) (Pinto *et al.*, 2015) (Konig *et al.*, 2009). Dependendo da tolerância que cada levedura apresenta às concentrações de etanol, estas irão sofrer com o seu aumento e, a certa altura acabam por não aguentar a toxicidade do mesmo, portanto, uma concentração elevada de etanol induz o final da fermentação. É sabido que uma concentração de etanol compreendida entre 3 % e 4 % (v/v) abranda o crescimento das leveduras, sendo que o seu crescimento é totalmente interrompido, mais uma vez dependendo das espécies, entre os 8 % e 15 % (v/v). Apesar de a *S. cerevisiae* ser considerada uma espécie bastante tolerante, esta também é afetada pelo aumento da concentração de etanol no meio, tendo como principais efeitos a alteração da organização e da permeabilidade da membrana plasmática. Estas alterações também são o que lhe permite sobreviver a estas adversidades, entre outros motivos, porque após estas alterações, a membrana consegue reter vitaminas e minerais essenciais para que o meio intracelular se mantenha viável nestas condições (Ferreira, 2004). O mesmo efeito é observado noutras espécies, bem como a diminuição da atividade da água que se verifica nas células destes microrganismos. Estes efeitos levam a uma acidificação do meio intracelular levando a uma situação de lise celular tornando a viabilidade do processo fermentativo nula, levando deste modo ao seu final (Ferreira, 2004).

As espécies supracitadas, que se constituem como competidores da espécie inoculada, como já referido, na maior parte das vezes é a *S. cerevisiae*, podem ser prejudiciais ao desenvolvimento da fermentação por diversos motivos: consomem nutrientes que seriam essenciais ao crescimento da levedura inoculada; produzem, ao longo da fermentação, grandes concentrações de ácido acético; e são, ainda, conhecidas por produzirem proteínas tóxicas (Ferreira, 2004) (Pinto *et al.*, 2015).

Outro componente do mosto são as bactérias produtoras de ácido acético (BAA) que se julgavam não sobreviver em meios anaeróbicos, condições que se observam durante a fermentação. No entanto vários estudos provaram que estas são capazes de sobreviver nestes meios (Ferreira, 2004). Existem várias espécies destas bactérias, entre as quais a *Gluconobacter oxydans*, que é a principal espécie encontrada nas uvas, uma vez que prolifera em ambientes ricos em açúcares, e as *Acetobacter* e as *Gluconacetobacter* que se encontram mais adaptadas em meios ricos em etanol, utilizando-o como fonte de carbono para o seu crescimento sendo, por isso, observadas frequentemente no final da fermentação.

Outros fatores que influenciam o crescimento das BAA são o oxigénio disponível, a temperatura, o pH, as concentrações de etanol e dióxido de enxofre e outros microrganismos presentes (Ferreira, 2004).

Como já foi citado, acreditava-se que as BAA não eram um problema nas fermentações alcoólicas, contudo dentro de determinadas condições de temperatura e pH, é possível a sua sobrevivência no produto final. Uma das formas possíveis de contrariar este problema é a adição do dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>). Este contribui para a sua inativação, mas não de forma suficientemente satisfatória. Além disso, é alvo de uma interdição legal sobre os valores que podem ser acrescentados ao vinho final, devido às preocupações com os riscos que este composto traz à saúde pública e que irá ser explorado mais à frente (Ferreira, 2004).

A presença das BAA tem uma influência direta ou indireta nas leveduras do mosto, acarretando, por este facto, uma influência negativa sobre o crescimento e desenvolvimento das mesmas e, por sua vez, no processo fermentativo. A diminuição da eficácia da fermentação devido à presença destas bactérias está associada a diversos fatores, entre eles a diminuição da glucose ou frutose (açúcares presentes no mosto) disponível para as leveduras devido à natureza glucofílica destas bactérias, no entanto, o principal fator está relacionado com a produção de ácido acético que é um produto tóxico para as espécies de leveduras presentes no mosto (Ferreira, 2004). Este ácido é conhecido como um dos produtos finais da fermentação e, por esse motivo, e devido à sua toxicidade (quanto mais elevada for a sua concentração menor será a capacidade de fermentação), um fator que influencia a escolha da espécie de levedura usada para fermentar o mosto é a baixa produção de ácido acético que esta possa induzir. No entanto, a sua produção é muito dependente da estirpe da levedura utilizada, uma vez que é possível observar valores de ácido acético produzido entre diferentes estirpes de *S. cerevisiae*, tendo sido por isso as estirpes divididas em grupos de acordo com as concentrações de ácido que originam: baixo (0.00 g/L até 0.30 g/L), médio (0.31 g/L até 0.60 g/L) e alto (superior a 0.60 g/L). Outros fatores como por exemplo a presença de leveduras doutro tipo que não as *Saccharomyces*, as concentrações de nitrogénio, a temperatura da fermentação ou um excesso de clarificação do mosto também podem originar valores de ácido acético mais elevados. Tal como acontece com o etanol, após este ácido, através de mecanismos descritos em literatura, entrar no meio intracelular das leveduras, acontece uma diminuição do pH deste e, por sua vez, a lise celular (Ferreira, 2004).

Na microflora do mosto também importa referir a presença de bactérias ácidas lácticas (BAL) que desempenham um papel importante na fermentação malolática das quais é possível destacar espécies do género *Oenococcus oeni*, as *Lactobacillus* e as *Pediococcus*. Estas bactérias, juntamente com as

leveduras são as que primeiramente se desenvolvem no mosto, logo após o esmagamento das uvas, mas com o crescimento das leveduras ao longo da fermentação alcoólica, estas assumem valores quase indetetáveis até à finalização desta. Após isto ocorre a fermentação malolática que induz um aumento de pH e de dióxido de carbono dissolvido no meio bem como uma diminuição de açúcares fermentáveis, condições ótimas para que a *O. oeni* possa prosperar (Ferreira, 2004) (Konig *et al.*, 2009).

Por fim, para além das leveduras, das BAA e das BAL encontradas no mosto, é possível observar também a presença de fungos, dos quais se destacam os filamentosos, como os *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Mucor* e *Alternaria*, sendo destas a espécie *Botrytis cinerea* a mais comum. A possível influência que estes têm no decorrer da fermentação depende da composição nutricional do meio, no entanto, as espécies referidas estão associadas à produção de ácido acético, tornando-se por isso num problema que se deve contrariar (Ferreira, 2004) (Konig *et al.*, 2009).

### **2.3.2. Propriedades físico-químicas do mosto**

Para termos o conhecimento aprofundado das características do mosto e dos porquês da utilização do tratamento que é proposto neste trabalho, também importa perceber as propriedades do mesmo relativamente aos seus valores de pH e a concentração de açúcares.

O pH do mosto varia entre 2.8 e 3.5, mas pode aumentar de acordo com um clima mais quente, mas também com uma prensagem das uvas mais forte que leva à maior libertação de potássio a partir das peles do fruto. Os valores de potássio presente no mosto podem influenciar positivamente o processo fermentativo uma vez que tornam espécies como as *Saccharomyces* mais tolerantes ao pH do meio, visto que aceleram a taxa de consumo da glucose, mas também ajudam no equilíbrio da acidificação citoplasmática, sendo que é trocado por iões de hidrogénio. Ainda assim, é preciso cautela pois níveis elevados de potássio podem induzir um decréscimo de pH para valores que poderão inibir a fermentação (Ferreira, 2004).

Por outro lado, os açúcares fermentáveis do mosto, normalmente hexoses, têm uma concentração muito variável nas uvas e, por sua vez, no mosto, dependendo da casta e da região onde foram produzidas. Estes constituem as fontes de carbono fundamentais à realização da fermentação, sendo os mais comuns a glucose e a frutose. Existem valores ideais para a concentração de açúcares iniciais no mosto uma vez que, uvas com elevadas concentrações irão originar fermentações com produção de etanol elevada, o que torna o meio muito tóxico. Irão, ainda, sujeitar as células a condições hipertónicas assim que ocorre a inoculação, levando a situações de morte celular devido às trocas de água induzidas por este meio, e a outros problemas relacionados, por exemplo, com o transporte de

açúcares e a sua afinidade ao substrato que é negativamente influenciada quando se observam concentrações muito elevadas de etanol. É, portanto, fundamental assegurar que a concentração de açúcares fermentáveis presentes no mosto é a suficiente para que a fermentação seja levada a cabo, mas que não a influencie negativamente, devendo estar compreendida entre os 20 % e os 25 % (Jackson, 2008) (Ferreira, 2004).

### **2.3.3. Outros fatores que influenciam a fermentação**

A microflora do mosto influencia bastante a fermentação, mas outro tipo de compostos também o faz. Para além do pH e das fontes de carbono já discutidas, importa referir a influência de, por exemplo, compostos nitrogenados, oxigénio, esteróis, entre outros.

Os compostos nitrogenados são essenciais para o bom funcionamento da atividade celular das leveduras pois concentrações iniciais destes no mosto muito baixas, que induzem atividade celular baixa, é um dos problemas que levam à paragem da fermentação. Diferentes estirpes de leveduras apresentam diferentes necessidades relativamente a estes compostos, por isso é importante perceber que concentração o mosto apresenta para utilizar a estirpe mais indicada. Apesar deste cuidado, esta escolha não irá influenciar a cinética da fase final da fermentação, portanto não é um método que garanta que a fermentação não amua ou para. Ao mesmo tempo, sabe-se que, elevadas concentrações podem levar a divisões celulares indesejadas e concentrações muito baixas induzem a produção de álcoois superiores, que em concentrações elevadas são prejudiciais, o que é mais um fator que revela a importância da seleção apropriada da levedura a utilizar (Jackson, 2008) (Ferreira, 2004).

A presença de álcoois, principalmente os superiores, influencia o desenvolvimento da fermentação. É sabido que estes se formam ao longo desta, dependendo das estirpes de leveduras que se utilizaram na inoculação, e que desempenham um papel importante nos aromas que a bebida alcoólica irá conter. No entanto, como já foi referido no caso do etanol, também estes são tóxicos para as estruturas celulares, podendo influenciar negativamente o meio intracelular das leveduras, tornando-o demasiado ácido e, influenciando também a capacidade nos mecanismos transportadores destas, o que faz com que a presença destes compostos tenha uma preponderância bastante relevante no desenvolvimento do processo fermentativo (Jackson, 2008) (Ferreira, 2004) (Gutierrez, 1993).

As vitaminas e os minerais são outros compostos que assumem relevância neste processo. É raro haver um défice destes no sumo da uva e, por conseguinte, no mosto. No entanto, quando o mosto é sujeito a elevadas concentrações de  $SO_2$ , ou algum processo de pasteurização, ou quando se verificam trocas iónicas, estes eventos podem determinar a redução dos níveis de tiamina, biotina e pantotenato

essenciais ao processo fermentativo, uma vez que funcionam como cofatores nas conversões enzimáticas do mesmo. Sabe-se ainda que espécies como a *Kloeckera apiculata* podem eliminar do meio, muito eficientemente, vitaminas como a tiamina. Apesar disto, também é possível concluir através de estudos anteriores que a maior parte das estirpes de *S. cerevisiae* são capazes de produzir as vitaminas essenciais (exceto a biotina). A tiamina, em particular, é uma vitamina usada como coenzima que permite estimular o crescimento das leveduras e aumentar a velocidade de fermentação (Ferreira, 2004) (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016). Existem também vários minerais essenciais ao crescimento das leveduras e, portanto, à fermentação alcoólica. Estes, normalmente, encontram-se no mosto em quantidades suficientes para suprir as exigências do processo fermentativo, no entanto, a sua ausência pode ser mais um problema a debelar, uma vez que minerais como o zinco e o magnésio afetam diretamente o metabolismo do açúcar (Ferreira, 2004).

Durante a fermentação alcoólica, o oxigénio não é utilizado para a produção de energia, mas desempenha um papel fundamental no crescimento celular sob pena de ocorrer uma diminuição na produção de biomassa e na taxa de glicólise devido a uma inibição da produção de ácidos gordos não saturados de cadeia longa e esteróis, compostos vulgarmente conhecidos como «fatores de sobrevivência». Também estes têm um papel crucial ao assegurar a integridade e a correta permeabilidade da membrana celular das leveduras e, portanto, um controlo da resistência aos níveis, cada vez mais elevados, da concentração de etanol. O principal problema que afeta os níveis de oxigénio disponível nas uvas são algumas enzimas que levam a cabo processos oxidativos, problema este contrariado com recurso ao SO<sub>2</sub> (Ferreira, 2004). Enquanto os ácidos referidos em cima são essenciais, os ácidos gordos de cadeia intermédia podem ser um fator negativo na fermentação, principalmente os ácidos octanóico e decanóico produzidos pelas leveduras. Importa, por isso, diferenciar os dois e estar alerta para os efeitos negativos dos últimos. A sua produção pode ser afetada de várias maneiras tais como a adição de oxigénio, o controlo da temperatura de fermentação, o grau de clarificação do mosto, entre outros, sendo sempre desejável que se consiga diminuir a sua proliferação no meio. Ambos os ácidos referidos estão diretamente ligados à diminuição da taxa máxima de crescimento da levedura *S. cerevisiae*, sendo, destes, o ácido decanóico o mais tóxico (Ferreira, 2004).

#### **2.3.4. Temperatura de fermentação**

A temperatura a que decorre a fermentação é um dos parâmetros essenciais na evolução do crescimento das leveduras no meio, na taxa de reações enzimáticas que ocorrem, entre outros. Um processo que decorra sob condições muito exigentes, quer sejam temperaturas muito elevadas, quer

sejam temperaturas muito baixas, irá ter vários problemas associados e a eficácia do mesmo será posta em causa. Da mesma forma, é possível afirmar que, fermentações alcoólicas que se encontrem em ambientes cuja temperatura possa variar entre 5 e 10 °C, irão sofrer um «choque térmico» que também provoca efeitos negativos na eficiência deste processo. O intervalo de temperaturas que é considerado como ideal para o crescimento das leveduras, em condições de produção vinícola, está compreendido entre os 15 e os 25 °C (Ferreira, 2004) (Mina and Tsaltas, 2013).

O efeito mais conhecido que a temperatura induz no processo fermentativo é a taxa de fermentação e conclusão da mesma, definida pelo consumo total dos açúcares disponíveis. Fermentações que se desenvolvam a temperaturas mais baixas, são mais lentas (foi possível observar que uma fermentação a 28 °C é 2.5 vezes mais rápida do que uma realizada a 15 °C), devido à redução da fluidez da membrana plasmática e, de certa forma, os enólogos assumem o risco de estas amuarem ou pararem demasiado cedo. Ao mesmo tempo, outros fatores de risco são a criação de fatores de stress como, por exemplo, níveis muito elevados de etanol ou ácidos gordos de cadeia intermédia na fase final da fermentação, compostos que, como já foi citado anteriormente, são tóxicos e prejudiciais à sua eficácia pois podem precipitar o seu término (Ferreira, 2004) (Mina and Tsaltas, 2013).

Apesar dos riscos das fermentações lentas, estas permitem obter maiores concentrações finais de compostos aromáticos de valor considerável o que é relevante visto que os vinhos brancos, e mantendo o foco sobre estes, são produtos apreciados pelo seu perfil aromático. Um processo fermentativo que ocorra num intervalo de temperaturas compreendido entre os 10 °C e os 15 °C potencia a produção e retenção de vários compostos aromáticos, fazendo com que estes vinhos sejam produzidos, preferencialmente, a partir de fermentações com temperatura controlada dentro do intervalo referido (Ferreira, 2004) (Mina and Tsaltas, 2013).

### **2.3.5. Perfil organolético**

Tendo sido realizado no trabalho testes que influenciaram a obtenção de vinhos com diferentes perfis aromáticos, releva inferir sumariamente o que pode influenciar estes.

Após a fermentação, o vinho obtido é composto por várias frações, entre as quais uma que corresponde aos compostos voláteis que contribuem para o aroma do vinho, cerca de 0.5 %, compostos esses normalmente conhecidos como *odour-active*. Vários fatores influenciam diretamente o surgimento destes compostos, sendo o mecanismo essencial de desenvolvimento dos mesmos, e de possível manipulação por parte dos enólogos, a fermentação.. Da mesma forma, existem outros que têm impacto

direto no desenvolvimento de um perfil aromático singular, entre os quais se destacam a temperatura de fermentação e a concentração inicial utilizada na inoculação da levedura (Mina and Tsaltas, 2013).

Entre os compostos que permitem o desenvolvimento de perfis aromáticos ímpares encontram-se, por exemplo, os ésteres, os aldeídos, álcoois, entre outros. Apesar da influência destes compostos, os primeiros aromas do vinho dependem, sobretudo, da casta das uvas usadas (Mina and Tsaltas, 2013).

Os ésteres são produzidos durante a fermentação alcoólica e são o grupo com maior importância e predominância no desenvolvimento do sabor do produto final. O perfil final de ésteres no vinho depende de vários parâmetros, mas é possível encontrar uma grande diversidade destes sendo que o grupo composto pelo etil acetato, isoamil acetato, isobutil acetato, etil caproato e 2-fenil acetato, é descrito como o mais influente no perfil organolético do vinho. Da mesma forma o acetaldeído e o diacetil, compostos carboxílicos formados ao longo da fermentação, são considerados desejáveis no produto final nas concentrações de 100 mg/L e de 1-4 mg/L, respetivamente, favorecendo a complexidade do aroma do vinho. Os álcoois superiores, já referidos anteriormente, podendo ser tóxicos, são desejáveis uma vez que contribuem para o aroma do produto final de forma positiva quando a sua concentração não excede os 300 mg/L (Mina and Tsaltas, 2013).

Como referido anteriormente, as fermentações a baixas temperaturas permitem que a formação destes compostos seja potenciada, permitindo um perfil aromático e organolético mais complexo e singular para cada vinho. O processo fermentativo a temperatura controlada tem particular influência sobre a formação de ésteres associados a aromas frutados muito prazerosos (Mina and Tsaltas, 2013).

A inoculação da levedura assume também um papel fundamental na velocidade da fermentação, devido à maior capacidade de degradação dos açúcares, mas também influencia diretamente o aroma do vinho obtido (Ferreira, 2004) (Mina and Tsaltas, 2013). Não existem muitos estudos nesta área, mas foi possível perceber que existe, de entre três inoculações estudadas ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  células/mL), uma que permite um desenvolvimento de compostos voláteis desejáveis, como são os ésteres, e uma diminuição da concentração de voláteis indesejados como os álcoois superiores, neste caso, foi a concentração de  $10^5$  células/mL (Mina and Tsaltas, 2013) (Carrau *et al.*, 2010). Portanto, é possível concluir que diferentes concentrações de inoculação irão produzir vinhos com diferentes perfis aromáticos.

## **2.4. Adição de dióxido de enxofre**

A utilização do SO<sub>2</sub> no processo de produção vitivinícola é muito antiga, mas não é consensual quando realmente começou a ser aplicada. Alguns autores afirmam que já era uma técnica utilizada pelos romanos e egípcios (Ferreira, 2004), enquanto outros afirmam que o início desta prática remonta ao século XVIII (Santos *et al.*, 2012). Seja qual for a sua origem, hoje é um processo altamente utilizado nesta indústria e de vital importância.

### **2.4.1. Tratamento com compostos sulfurosos**

Atualmente, e ao longo das últimas décadas, o uso do SO<sub>2</sub> tornou-se indispensável na indústria alimentar, especialmente em produtos com baixo pH como por exemplo sumos de fruta ou bebidas fermentáveis como o vinho, uma vez que o seu caráter antisséptico e antioxidante é muito conhecido e eficaz (Ferreira, 2004) (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012). Funciona, portanto, como um composto bastante útil para preservar a segurança microbiológica do vinho pois inibe o desenvolvimento de vários microrganismos como as BAL e as BAA, atua como antioxidante reagindo diretamente com o oxigénio, entre outros, previne alterações de cor do vinho, ainda que, devido à complexidade das reações em que o SO<sub>2</sub> está envolvido como os outros componentes do vinho, este possa influenciar o sabor e aroma do mesmo (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012).

Este composto existe, naturalmente, no vinho pois os sulfitos são subprodutos da fermentação a partir de leveduras. O composto pode estar presente na sua forma molecular, na forma de ião bissulfito e na forma de ião sulfito, (SO<sub>2</sub>, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> e SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, respetivamente). A forma predominante em que é possível encontrá-lo no meio é definido pelo pH do mesmo sendo que quanto mais ácido este for, maior será a percentagem da forma molecular (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). Esta é a forma com maior capacidade antimicrobiana e antioxidante. Apesar destas propriedades é preciso ter bastante cuidado aquando da adição de SO<sub>2</sub> ao vinho uma vez que dosagens insuficientes não asseguram a sua proteção e estabilização microbiológica, pois não impede a proliferação de leveduras e bactérias, e dosagens demasiado elevadas podem causar alterações organoléticas e pôr em causa a segurança alimentar do produto. A dosagem que permite um tratamento adequado do vinho está compreendida entre os 10-20 mg/L de SO<sub>2</sub> livre (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

De acordo com estudos realizados anteriormente é possível perceber que existem indivíduos que reagem mal à ingestão dos compostos sulfurosos referidos. Estes podem sofrer diversos sintomas como por exemplo urticária, dores abdominais, diarreias entre outros, podendo ser bastante mais severos



numa população que seja asmática e dependentes de esteroides (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012).

Devido a este problema, a *International Organization of Vine and Wine* (OIV) tem vindo a restringir progressivamente o limite da concentração máxima dos compostos supracitados permitida nos vinhos estando, neste momento, situada nos 150 mg/L para os vinhos tintos e nos 200 mg/L nos vinhos brancos (Comissão Europeia, 2009) (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012).

Tendo tudo isto em conta é essencial construir alternativas viáveis à adição de SO<sub>2</sub> ao vinho. No entanto, não existe nenhum produto que seja capaz de substituir o SO<sub>2</sub> assegurando o cumprimento das suas propriedades fundamentais e necessárias à estabilização microbiológica do vinho. No entanto, é possível, com algumas estratégias, reduzir a adição de compostos sulfurosos ao vinho final, limitando ao máximo a sua concentração ao que é produzido naturalmente pelas leveduras, ainda que a estabilidade microbiológica do vinho seja algo incerto (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012).

A remoção do SO<sub>2</sub> normalmente é feita através de um equipamento chamado dessulfizador que é, basicamente, uma coluna de destilação. O mosto é aquecido até temperaturas entre os 110 °C e os 120 °C, com recurso a um permutador de calor, caindo numa coluna de vapor e libertando a sua fração volátil, o SO<sub>2</sub>. O vapor de água junto com o SO<sub>2</sub> libertado origina ácido sulfuroso (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), este conjunto de ar é forçado a atravessar um banho de óxido de cálcio, dando-se a neutralização do SO<sub>2</sub>, obtendo-se o mosto de uva livre deste composto

#### **2.4.2. Estratégias alternativas ao tratamento**

Diferentes tecnologias e metodologias físicas e microbiológicas podem ser utilizadas para produzir vinhos com concentrações menores de SO<sub>2</sub>. Entre estas, a primeira metodologia que se pode utilizar é a escolha cuidada da estirpe da levedura a utilizar na inoculação. Para além dos cuidados a ter, já referidos anteriormente no tópico referente à fermentação alcoólica, este é mais um dos parâmetros que deve condicionar esta escolha. A *S. cerevisiae* é uma das leveduras que produz sulfitos, sendo que a maior parte das estirpes produz entre 10 a 30 mg/L, no entanto existem algumas que produzem menos do que 10 mg/L sendo consideradas estirpes de baixa formação de sulfitos. Pelo contrário, existem outras, estirpes de elevada formação de sulfitos, que produzem valores destes compostos acima dos 100 mg/L. Um dos produtos indesejáveis da atividade das leveduras, devido ao cheiro e sabor desagradáveis que provoca é o H<sub>2</sub>S, cuja formação está diretamente ligada à produção de SO<sub>2</sub> e à estirpe que se utiliza. Durante os últimos anos a escolha cuidadosa das estirpes a utilizar tem sido uma das estratégias fundamentais para reduzir a quantidade de SO<sub>2</sub> nos vinhos (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016).

Outro fator que deve ser tido em conta é a temperatura de fermentação. Como vimos anteriormente, a ocorrência do processo fermentativo a baixas temperaturas favorece a qualidade do vinho, principalmente dos brancos, contudo sabe-se que os efeitos que esta baixa temperatura provoca nas propriedades bioquímicas e fisiológicas das células podem levar a que a produção de SO<sub>2</sub> aumente. Outros fatores associados à produção tanto deste como do H<sub>2</sub>S são o pH do meio, a concentração de alguns minerais e vitaminas (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016).

Apesar dos cuidados a ter, referidos nos parágrafos anteriores, as tecnologias físicas para diminuir a utilização de SO<sub>2</sub> têm-se mostrado como as mais vantajosas devido a diversos fatores, entre estes destacam-se a possibilidade de se afirmarem como tendo um caráter antimicrobiano, a manutenção das características organolépticas do vinho e a não adição de compostos químicos potencialmente prejudiciais à saúde dos consumidores que cada vez mais se preocupam em consumir produtos mais naturais (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012).

Nas próximas secções serão apresentadas algumas metodologias físicas cuja aplicação só começou a ser estudada muito recentemente. Entre estas destacam-se a aplicação de campos elétricos de alta voltagem com pulsos de curta duração (PEF), a utilização de campos elétricos moderados (MEF) e o aquecimento *óhmico* (OH).

## **2.5. Processamento por campos elétricos**

Desde há muitos anos que a segurança alimentar é algo que preocupa as sociedades e, por isso, os produtos alimentares são tratados para assegurar que não se desenvolvem microrganismos patogénicos, utilizando técnicas que usam os efeitos térmicos sobre os alimentos, fazendo com que tempo de prateleira seja o mais prolongado possível. Os métodos tradicionais, como referido, utilizam técnicas baseadas na aplicação de calor, como a pasteurização que aumenta a segurança dos alimentos, ou técnicas como a desidratação que permite reduzir a atividade da água e aumentar o tempo de prateleira. Contudo, estes tratamentos convencionais podem afetar negativamente o produto final provocando alterações na cor, no sabor, bem como nos valores nutricionais do mesmo, uma vez que muitos dos compostos responsáveis pelas qualidades organolépticas do produto são componentes sensíveis ao calor, tal como as vitaminas e os minerais (Machado *et al.*, 2010) (Demirdöven and Baysal, 2015).

### **2.5.1. Campos elétricos induzidos por pulsos (*Pulsed electric fields – PEF*)**

Nas últimas décadas a escassez de recursos, os consumos energéticos e a segurança alimentar são algo que cada vez mais preocupa os consumidores (Rocha *et al.*, 2018). Na tentativa de assegurar

produtos com mais qualidade, mais seguros e menores desperdícios na sua produção, essencialmente energéticos, têm sido realizados diversos estudos com o intuito de se implementarem novas tecnologias que permitam alcançar estes objetivos, assim como, reduzir a adição de compostos sulfurosos no produto final (no caso particular dos vinhos). Têm, então, sido usadas tecnologias que combinam efeitos térmicos e não térmicos recorrendo a campos elétricos. Diversos estudos demonstram que esta combinação tem uma melhor performance na inativação de microrganismos e enzimas nos alimentos (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012) (Wu *et al.*, 2020). Entre estas novas tecnologias, destaca-se a utilização de campos elétricos de alta voltagem induzidos através de pulsos de curta duração (PEF), principalmente em sumos de uvas e vegetais que se tem revelado como uma das técnicas mais promissoras. Este método consiste em colocar os produtos entre dois eletrodos que serão responsáveis pela formação do campo elétrico. O campo elétrico irá provocar a formação de poros na membrana celular dos diversos microrganismos presentes – fenómeno conhecido por eletroporação -, aumentando a permeabilidade da mesma, afetando as estruturas intracelulares e conseqüentemente determinar a lise celular (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012) (Rocha *et al.*, 2018) (Garde-Cerdán *et al.*, 2008a) (Wu *et al.*, 2020).

Vários estudos permitiram concluir que estes métodos permitem a inativação de bactérias e leveduras, bem como reduzir a atividade de algumas enzimas, como as polifenol-oxidases e as peroxidases e aumentam a extração de compostos fenólicos na fração líquida do mosto. A sua influência na segurança e qualidade dos vinhos tem sido estudada (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Garde-Cerdán *et al.*, 2008a). Alguns destes estudos (Puértolas *et al.*, 2009) demonstram a influência positiva sobre a inativação microbiana e, portanto, a segurança que este induz no mosto e/ou no vinho, evitando a contaminação do produto ao longo de todo o processamento e também da fase de envelhecimento do vinho. Por outro lado, foi igualmente possível evidenciar que o mosto tratado com esta técnica tem uma redução significativa, ou até uma eliminação, da concentração de SO<sub>2</sub> sem afetar os componentes voláteis, fazendo com que o aroma final do vinho não seja afetado (Garde-Cerdán *et al.*, 2008b). Foi, também, possível observar que os compostos nitrogenados, os ácidos gordos ou os componentes nutritivos essenciais ao crescimento das leveduras não são afetados. Ainda foi possível provar a redução do tempo de maceração (Puértolas *et al.*, 2010), quando se utiliza esta fase do processamento, o aumento da intensidade da cor do vinho, do conteúdo de antocianinas e da totalidade de polifenóis comparando com o vinho obtido sem a utilização do tratamento descrito (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012) (Puértolas *et al.*, 2011).

Concluiu-se, por isso, que a utilização deste método permite a inativação de microrganismos sem afetar as características organolépticas e nutritivas do mosto e do vinho, assegurando, em certa parte, a estabilidade microbiológica do produto com baixo consumo elétrico e um processamento rápido e possível de aplicar em qualquer fase do processo. Ainda que este método não permita, por completo, a eliminação da utilização do SO<sub>2</sub>, é uma excelente forma de diminuir a sua aplicação (Ferrer-Gallego *et al.*, 2016) (Santos *et al.*, 2012) (Garde-Cerdán *et al.*, 2008a) (Garde-Cerdán *et al.*, 2007).

### **2.5.2. Campos elétricos moderados (*Moderate electric fields – MEF*)**

Uma tecnologia semelhante e com elevado interesse é a utilização de campos elétricos moderados (MEF), esta apresenta-se como uma alternativa ao PEF pois exige menores recursos energéticos e permite obter os mesmos efeitos enquanto é possível controlar a permeabilização da membrana e outros efeitos não térmicos (Machado *et al.*, 2010) (Wang *et al.*, 2020).

A utilização de MEF é caracterizada pela aplicação de campos elétricos significativamente mais reduzidos do que aquando da utilização do PEF, utilizando campos elétricos compreendidos entre 1 e 1000 V/cm. Vários estudos demonstraram que a aplicação destes campos elétricos, combinados com temperaturas moderadas, têm um efeito significativo na inativação microbiana, como por exemplo na eliminação de bactérias como *Escherichia coli* ou em esporos, assegurando que esta ocorre devido às correntes aplicadas e não aos efeitos térmicos (Machado *et al.*, 2010) (Wang *et al.*, 2020).

### **2.5.3. Aquecimento Óhmico (OH)**

Esta tecnologia, também conhecida como efeito ou aquecimento de Joule, baseia-se no mesmo princípio das tecnologias anteriores, de que a maior parte dos produtos alimentares apresentam condutividade elétrica que permite a corrente elétrica passar através destes. A corrente aplicada, normalmente corrente alternada, uma vez que permite controlar a existência de reações químicas indesejáveis, através de dois eletrodos em contacto direto com o produto a tratar, origina o aquecimento devido à resistência elétrica do alimento. Contrariamente à utilização de PEF, este método conjuga a aplicação de MEF com a dissipação de calor, e também se distingue dos primeiros por ter um controlo da temperatura muito fácil de se efetuar. O OH será sempre um efeito secundário da aplicação de campos elétricos em meios semi condutores, significa isto que, no meio onde é aplicado MEF poderá acontecer um aumento da temperatura devido ao efeito de Joule, que é dependente da condutividade elétrica do alimento, da força do campo elétrico, da voltagem aplicada, do tempo de tratamento e da viscosidade, acontecendo assim o OH (Rocha *et al.*, 2018) (Alcántara-Zavala *et al.*, 2019) (Pereira *et al.*, 2020) (Pereira and Vicente, 2010).

Como referido anteriormente, existem certos parâmetros essenciais que influenciam a taxa de aquecimento da matriz alimentar, afetando, por sua vez, a eficácia deste tratamento. Um desses, que é considerado o mais crítico, é a condutividade elétrica do produto uma vez que define se este é passível de ser tratado desta forma ou não e, ainda define as taxas de eficiência e de aquecimento que se obtêm. A condutividade elétrica do produto está diretamente associada à estrutura e ao tipo de ligações químicas presentes na matriz do alimento, sendo que parâmetros como a força iónica e a presença de iões aumentam os valores desta. Também é sabido que o aumento da temperatura por efeito de Joule é tanto maior quanto maior for o valor de condutividade elétrica do alimento a tratar (Santos, 2019).

Uma instalação que permite aplicar este tratamento tem como instrumentos principais os elétrodos, o reator onde irá ser colocada a amostra, a fonte de corrente elétrica, uma unidade de controlo da voltagem aplicada, um ou mais termopares e um sistema de aquisição de dados (Dias, 2018).

O OH tem-se mostrado como uma das novas eletrotecnologias mais promissoras e com grande aplicabilidade industrial, com especial relevância na indústria alimentar uma vez que permite controlar microbiologicamente e enzimaticamente o produto assegurando as suas características físico-químicas e, por sua vez, a sua segurança e qualidade. O controlo dos microrganismos do meio ocorre devido à eletroporação ou perturbação que o OH induz na membrana celular (Rocha *et al.*, 2018) (Alcántara-Zavala *et al.*, 2019) (Pereira *et al.*, 2020). Para além desta capacidade de controlo microbiano que este tratamento apresenta, existem várias outras vantagens. Entre as quais destacam-se a capacidade de aquecer líquidos de forma uniforme com taxas de aquecimento elevadas, uma vez que são produtos com elevada condutividade térmica, reduz os efeitos de *fouling*, quando comparado com os métodos tradicionais, assegura as características organoléticas do produto quando comparado com tecnologias que utilizam apenas os efeitos térmicos para tratamento do alimento, têm custos de manutenção baixos e grandes valores de conversão energética o que permite afirmar-se como uma tecnologia verde e permite o aumento do tempo de prateleira dos produtos. Estas vantagens permitem uma aplicação industrial muito abrangente, que incluem os processos fermentativos (Alcántara-Zavala *et al.*, 2019) (Pereira *et al.*, 2020) (Pereira and Vicente, 2010). Por último, subsistiam várias dúvidas sobre o real efeito que este tratamento poderia promover sobre os microrganismos, enzimas e nutrientes (Pereira and Vicente, 2010), no entanto ao longo dos últimos anos, têm sido realizados diversos estudos para verificar e clarificar estes efeitos. Atualmente grande desvantagem que esta tecnologia apresenta é a elevada despesa exigida aquando do investimento inicial (Pereira and Vicente, 2010).

Em 2010, Machado *et al.* pretenderam avaliar a cinética de morte da *Escherichia coli* através da aplicação de MEF, assegurando que as observações efetuadas não se deviam a efeitos térmicos (ensaios foram realizados à temperatura ambiente), mas sim devido a efeitos decorrentes da aplicação do campo elétrico. Para tal, procederam à aplicação de MEF com controlo de temperatura que nunca ultrapassou os 25 °C, temperatura que não é letal para o microrganismo em questão. O tratamento desenvolveu-se com a aplicação de campos elétricos entre 50 e 280 V/cm durante um intervalo de tempo compreendido entre os 2.5 min e os 20 min. Perante este tratamento foi possível concluir que o campo elétrico tem grande influência na cinética de morte da *E. coli* pois a taxa de morte a 280 V/cm é muito superior à verificada aquando do tratamento de 50 V/cm, sendo ainda possível perceber que os efeitos se tornam bastante significativos em valores superiores a 160 V/cm. Para valores superiores a 220 V/cm a carga microbiana é reduzida, em menos de 6 min, em 3 ciclos logarítmicos. Para qualquer valor de campo elétrico utilizado, foi possível observar danos na membrana celular – através de técnicas de microscopia (Machado *et al.*, 2010).

Noutro trabalho, Pereira *et al.* estudaram a influência do campo elétrico não só na cinética de morte da *E. coli* presente no leite de cabra, mas também em esporos de *Bacillus licheniformis* na compota de amora silvestre. Em ambos os casos, foram efetuados dois tratamentos, um que recorreu ao aquecimento convencional e outro que, por contrário, recorreu ao aquecimento óhmico, em determinadas temperaturas, para efetuar as comparações necessárias. No caso dos esporos de *Bacillus licheniformis* foram comparadas as temperaturas de 70 °C, 75 °C e 80 °C, já no caso da *E. coli* foram comparadas as temperaturas de 55 °C, 60 °C, 63 °C e 65 °C. Foi então possível observar que, para os valores de temperatura compreendidos entre os 60 °C e os 75 °C, o tratamento que recorreu ao aquecimento óhmico necessitou de menos tempo para obter os mesmos valores de inativação da *E. coli* que se observaram no aquecimento tradicional. Da mesma forma, no caso da inativação dos esporos de *B. licheniformis*, verificaram-se os mesmos efeitos para temperaturas entre os 70 °C e os 90 °C, ainda que estes resultados não tenham sido considerados estatisticamente relevantes. Tendo em conta a manutenção do perfil térmico em ambos os tratamentos, foi possível concluir que a aplicação de campos elétricos favorece a inativação microbiana – efeitos de inativação não-térmicos. Este favorecimento indicia vantagens para a indústria alimentar, uma vez que os efeitos negativos dos tratamentos térmicos podem ser contornados (Pereira *et al.*, 2006).

Num estudo de 2019, Alcántara-Zavala pretendeu comparar a utilização do OH com a pasteurização convencional e o seu efeito nas características físico-químicas, nas propriedades

probióticas e no tempo de prateleira do *pulque*, bebida alcoólica típica da América Central. Neste estudo foi possível concluir que o processamento desta bebida através de aquecimento ôhmico com voltagens superiores a 100 V, com temperatura máxima de 65 °C e durante 5 min ou 7 min, permitiu uma preservação das propriedades físico-químicas, probióticas e sensoriais do produto para além de ter aumentado o tempo de prateleira do mesmo em 22 dias (armazenado a 4 °C). O tratamento convencional, apresentou como principais problemas a aceitação das propriedades sensoriais e a diminuição das LAB contidas no *pulque* comparado com o processamento por OH. Estas LAB, nomeadamente as *Lactobacillus acidophilus* e as *Lactobacillus kefir*, são essenciais para as características probióticas do produto, afetando a qualidade do mesmo (Alcántara-Zavala *et al.*, 2019).

### **3. Materiais e Métodos**

O presente capítulo encontra-se dividido em cinco partes, cada uma referente a fases distintas do processo. A primeira parte destina-se à descrição de métodos de preparação do mosto para ser possível o seu tratamento, segue-se a apresentação dos métodos de caracterização física e química do mosto e uma secção na qual são descritas as condições de tratamento a que o mosto foi sujeito; esta é seguida das condições de fermentação utilizadas; por fim, são descritos os métodos de caracterização física e química dos vinhos obtidos.

#### **3.1. Preparação do mosto**

Antes de qualquer passo de análise ou tratamento foi necessário proceder à preparação do mosto, proveniente das vindimas em diversas quintas como a Quinta dos Ingleses em Lousada (mosto A), a Quinta das Arcas em Valongo (mosto B), a Quinta Agrolongo em Amares (mosto C) e, por fim, a Quinta da Bromela em Celorico de Basto (mosto D). Após receção do mosto este foi congelado em garrações de 5 L e mantido em arcas congeladoras até 24 h antes do início dos tratamentos. A este mosto não foi adicionado qualquer tipo de composto sulfuroso.

Após a sua descongelação, o mosto foi sujeito a processos de filtração em malhas de alumínio ou em panos próprios para o efeito, tendo também sido realizada uma decantação para eliminar os resíduos sólidos que depositaram no recipiente onde o mosto esteve armazenado.

Este procedimento foi o que se utilizou de forma mais regular. No entanto, ao longo do trabalho, com o objetivo de avaliar alguma possível diferença na etapa de fermentação, também se utilizou mosto fresco, proveniente da Quinta de Agrolongo e da Bromela, analisado de acordo com as indicações descritas na secção seguinte – tal como o mosto congelado. Considerou-se, mosto fresco, o mosto utilizado sem que este fosse sujeito a um processo de congelamento. A diferença mais significativa na utilização do mosto fresco foi a inutilidade do processo de decantação uma vez que não existiam partículas sólidas depositadas, portanto excluiu-se esse passo na preparação do mosto fresco.

#### **3.2. Caracterização física e química do mosto**

Todas as amostras de mosto utilizadas foram sujeitas a uma série de análises físicas e químicas para as caracterizar antes de se efetuarem as fermentações. Estas análises incidiram sobre a medição da densidade, da acidez total (AT), da medição de pH, a concentração de açúcares redutores (AR) e a condutividade elétrica do mosto.



A medição de pH foi realizada através de um aparelho próprio para o efeito (HACH, sensiON™+ PH3, HACH-LANGE, SLU).

A concentração de açúcares foi determinada através da utilização do método de DNS. Para tal, e tendo em conta o largo período em que o trabalho foi realizado, foram, sempre que necessário, revistas as curvas de calibração. Para determinação das mesmas utilizou-se glucose em concentrações de 0,4 g/L até 3,2 g/L. As várias equações obtidas para as diferentes calibrações realizadas são descritas na Equação 1, na Equação 2 e na Equação 3 e apresentaram coeficientes de correlação de 0,9983, 0,9917 e de 0,9991, respetivamente.

$$\frac{AR}{g/L} = \frac{Abs_{540nm} - 0,0101}{0,2821} \quad \text{Equação 1}$$

$$\frac{AR}{g/L} = \frac{Abs_{540nm} - 0,0217}{0,2666} \quad \text{Equação 2}$$

$$\frac{AR}{g/L} = \frac{Abs_{540nm} - 0,0133}{0,2474} \quad \text{Equação 3}$$

Para efetuar a análise da absorvância a 540 nm foram colocados 0,1 mL de mosto e 0,1 mL de DNS em três eppendorfs que foram colocados durante 5 min em água a 100 °C. Logo de seguida acrescentou-se 1 mL de água destilada a cada Eppendorf, dos quais, após agitação, foram retirados 200 µL para três poços de uma placa de 96 poços. A leitura da absorvância nas microplacas foi realizada num leitor de placas ELISA (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

Tendo em conta a variabilidade demonstrada em diversas análises, recorreu-se à utilização de um modelo matemático que permitiu obter perfis da concentração de AR mais perceptíveis e fáceis de analisar. Também permitiu obter outros parâmetros que foram utilizados na caracterização das diversas fermentações. O modelo utilizado recorre aos valores iniciais de AR e através da Equação 4 determina o perfil de concentração de AR ao longo do tempo (Speers *et al.*, 2010).

$$\frac{AR}{g/L} = \frac{a}{1 + e^{-k(X - X_c)}} \quad \text{Equação 4}$$

Na Equação 4,  $a$  representa o valor inicial de concentração de AR,  $k$  representa o declive da curva que se irá obter através do modelo,  $X$  é o tempo de fermentação enquanto  $X_c$  é o ponto de inflexão da curva em horas.

O cálculo da AT, em gramas de ácido tartárico por litro, foi efetuado de acordo com o método OIV-MA-AS313-01. Utilizou-se como indicador o azul de bromotimol com uma solução aquosa de NaOH

0,1 mol/L, sob agitação, até obtenção da cor azul-verde. O indicador foi obtido a partir de uma mistura de 10 mg de azul de bromotimol em 10 mL de etanol 96 % à qual se adicionou 10 mL de água destilada. A Equação 5 representa a relação do volume de NaOH titulado aquando do surgimento da coloração pretendida e a correspondente acidez do mosto.

$$\frac{AT}{g/L} = \frac{V_{NaOH}}{mL} \times 10 \times 0,075 \quad \text{Equação 5}$$

O último parâmetro registado para a caracterização física e química do mosto foi a medição da condutividade elétrica do mosto, através de um medidor Hanna Edge Conductivity Meter.

### 3.3. OH aplicado ao mosto

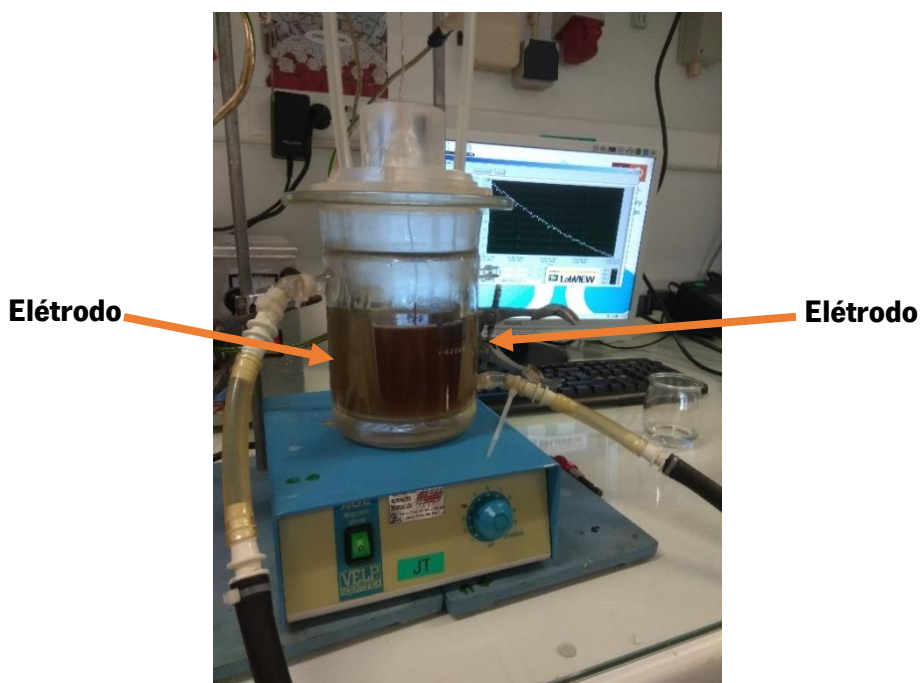
De forma a proceder à inativação microbiológica do mosto para posterior fermentação e, assim, se avaliar os efeitos deste nesta fase da produção vinícola, procederam-se a diversos tratamentos por aquecimento óhmico utilizando um reator cilíndrico com capacidade de 500 mL, com dois elétrodos de aço inoxidável 316, com área superficial de 49 cm<sup>2</sup>, a uma distância entre si de 8 cm que permitiu aplicar ao mosto um campo elétrico de 50 V/cm. De forma a assegurar que o mosto era tratado de forma uniforme, o reator foi colocado em cima de um agitador e foi introduzido um magneto durante o tratamento. Apesar da capacidade total ser de 500 mL, o mosto introduzido não poderia ultrapassar o limite dos elétrodos, portanto foram tratados, de cada vez, entre 250 mL a 300 mL de mosto, até perfazer um total de, pelo menos, 1 L. O reator utilizado está representado na Figura 7.

A medição da temperatura ao longo do tratamento foi efetuada através da utilização de um termopar tipo k ligado a um computador, onde foi possível acompanhar os perfis de temperatura através de um módulo de aquisição da National Instruments (USB-9161, National Instruments Corporation, Austin, TX, USA).

Na Tabela 2 encontram-se descritos dois tipos de tratamentos que foram aplicados ao mosto. Como é possível perceber, as condições experimentais de ambos os tratamentos foram bastante semelhantes, sendo apenas diferenciados pelos números de pulsos de corrente aplicados ao mosto e pelas temperaturas atingidas, sendo que ambas foram estipuladas para assegurar que os resultados observáveis estariam relacionados com efeitos não-térmicos (Machado *et al.*, 2010) (Pereira *et al.*, 2006).

De acordo com trabalhos anteriores (Santos, 2019), estabeleceu-se como prioridade a utilização do tratamento *Óhmico 1*, como aquele a utilizar numa fase inicial do trabalho para ser possível perceber e avaliar de alguma forma os efeitos mais imediatos do tratamento sobre a fermentação. Ao longo do

processo laboratorial definiu-se um novo protocolo de tratamento, o *Óhmico 2*, com o intuito de definir tempos de tratamento menores. Definiu-se então como protocolo um tratamento de apenas um pulso elétrico, sujeitando o mosto à temperatura máxima de 70 °C de forma a assegurar a inativação microbiana por efeito elétrico e térmico (Machado *et al.*, 2010) (Pereira *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Reator (com refrigeração) utilizado para os diversos tratamentos.

**Tabela 2 -** Descrição das condições dos dois tratamentos utilizados

Tratamento	Tensão Elétrica / V	Nº de Pulsos	Temperatura alvo / °C	Refrigeração	$\Delta t$ / min
Controlo	-	-	-	-	-
<i>Óhmico 1</i>	400	3	50	Sim (5 a 15 °C)	20
<i>Óhmico 2</i>	400	1	70	Sim (5 a 15 °C)	2

No entanto, os efeitos que este tratamento provoca na cinética de fermentação são ainda desconhecidos. Ao longo do trabalho foram avaliados diversos parâmetros e privilegiou-se a utilização do tratamento que evidenciava resultados mais promissores tendo em conta a sua influência no binómio tempo de tratamento/cinética de fermentação.

### 3.4. Condições de fermentação

As fermentações foram levadas a cabo em ambiente empresarial, ainda que num laboratório, para que decorressem sob condições de temperatura, humidade, entre outras próximas da realidade de qualquer adega. Qualquer um dos mostos que foi sujeito a fermentação, fizesse parte das amostras de controlo, das sujeitas ao tratamento *Óhmico 1* ou ao *Óhmico 2*, foram colocados em matrizes ou balões volumétricos esterilizados, com a capacidade de 1 L.

Todas as fermentações foram acompanhadas através de métodos proximais, como por exemplo a avaliação da densidade, a análise de AR presentes através do método do DNS (métodos descritos na secção 3.2) e, sempre que necessário, através de análise visual. A Figura 8., demonstra uma das instalações que foi feita no laboratório da empresa para acompanhar a fermentação.



**Figura 8.** Instalação para acompanhamento da fermentação de dois mostos: à esquerda uma amostra de controlo e à direita uma amostra sujeita a tratamento *Óhmico 1*.

Ao longo das fermentações foram estudados os efeitos de dois parâmetros essenciais: a concentração de levedura inoculada bem como a temperatura de fermentação, uma vez que, como referido ao longo da secção 2, estes são dois fatores determinantes quer no arranque, quer na eficiência da fermentação. Como tal, e para verificar os efeitos de diferentes inoculações recorreu-se a um processo de reidratação da levedura escolhida para proceder à inoculação. Para tal foi preparada uma solução de 100 mL de uma outra solução de glucose e frutose adicionada a 100 mL de água a 50 °C, na qual foi

diluído 1 g de uma mistura de nutrientes (NUTRIACTIV) – a mesma massa da mistura de nutrientes foi dissolvida em cada matraz ou balão volumétrico de mosto. À solução, descrita anteriormente, foram adicionados 10 g de levedura desidratada (alfa Collection KB12). Posteriormente, o inóculo foi deixado a repousar durante cerca de 30 min para permitir a reidratação da levedura. Finalmente, a cada matraz contendo 1 L de mosto foram adicionados 10 mL ou 5 mL do inóculo. Inicialmente foi estudada a possibilidade de otimizar o inóculo de menor concentração de levedura de forma a induzir automaticamente uma melhoria processual em termos económicos.

No caso da temperatura de fermentação, avaliaram-se as diferenças entre fermentações realizadas à temperatura ambiente e fermentações levadas a cabo a temperatura controlada de 15 °C. Para efetuar o controlo da temperatura, os matrizes foram colocados dentro de um banho termostatizado de forma a manter a temperatura constante. Como já foi referido no parágrafo anterior, numa fase mais adiantada do trabalho, apenas se utilizou o método que apresentou melhores resultados.

Dois parâmetros importantes na análise dos resultados obtidos foram a determinação da produtividade (P) e do rendimento (r) (Comissão Europeia, 1990) de cada fermentação levada a cabo. Para determinar estes parâmetros utilizaram-se a equação 6 e 7.

$$\frac{P}{g/L.h} = \frac{[C_2H_5OH] / g/L}{t / h} \quad \text{Equação 6}$$

$$\frac{r}{\%} = \frac{\% v/v_{final} \times 16,83}{AR_{iniciais}} \quad \text{Equação 7}$$

Com o intuito de perceber de forma mais eficaz a velocidade de fermentação de cada uma das fermentações, foi determinada a taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) baseada na análise consumo dos AR de cada mosto. Para tal, utilizou-se a equação 8 (Sipos, 2016).

$$\left| \frac{\mu}{s} \right| = \left| \frac{\ln(X/X_0)}{t} \right| \quad \text{Equação 8}$$

Nesta, X representa uma concentração de AR num determinado t e  $X_0$  representa a concentração de AR no momento inicial do controlo da fermentação.

### 3.5. Codificação dos mostos

De forma a facilitar a identificação de cada mosto tratado e analisado, foram designados códigos de acordo com a seguinte ordem: 1) tipo de mosto (A, B, C ou D); tipo de tratamento, como não-tratado, ohmico 1 e ohmico 2 (N, P, e O, respetivamente); de acordo com o tratamento; concentração do inóculo

de levedura de 0,10 e 0,05 g/L (1 e 2, respetivamente); e temperatura de fermentação de 15 e 25 °C (1 e 2 respetivamente). Na Tabela 3 está descrita a chave utilizada para a codificação dos mostos e o código final de cada um. Sendo que por exemplo o mosto A, tendo sido tratado por aquecimento *Óhmico 1*, na fermentação nº1 com 0,1 g/L de levedura, e a uma temperatura de fermentação de 25 °C terá o código de amostra AP112.

**Tabela 3** - Codificação dos vários mostos tratados e fermentados

<b>Mosto</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Fermentação</b>	<b>Inóculo / (g/L)</b>	<b>T Ferm. / °C</b>	<b>CÓDIGO</b>
A	Controlo	1	0,10	25	<b>AN112</b>
	<i>Óhmico 1</i>		0,10	25	<b>AP112</b>
A	Controlo	2	0,10	25	<b>AN212</b>
	<i>Óhmico 1</i>		0,10	25	<b>AP212</b>
	<i>Óhmico 1</i>		0,05	25	<b>AP222</b>
A	Controlo	3	0,10	25	<b>AN312</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,10	25	<b>A0312</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	25	<b>A0322</b>
A	Controlo	4	0,10	25	<b>AN412</b>
	<i>Óhmico 1</i>		0,10	25	<b>AP412</b>
	<i>Óhmico 1</i>		0,05	25	<b>AP422</b>
B	Controlo	5	0,05	25	<b>BN522</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	25	<b>B0522</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	25	<b>B0522</b>
C	Controlo	6	0,05	25	<b>CN622</b>
	Controlo		0,05	15	<b>CN621</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	25	<b>C0622</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	15	<b>C0621</b>
	<i>Óhmico 1</i>		0,05	25	<b>CP622</b>
	<i>Óhmico 1</i>		0,05	15	<b>CP621</b>
C	Controlo	7	0,05	15	<b>CN721</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	15	<b>C0721</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	15	<b>C0721</b>
D	Controlo	8	0,05	15	<b>DN821</b>
	Controlo		0,05	15	<b>DN821</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	15	<b>D0821</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	15	<b>D0821</b>
D	<i>Óhmico 2</i>	9	0,05	15	<b>D0921</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	15	<b>D0921</b>
	<i>Óhmico 2</i>		0,05	15	<b>D0921</b>

### 3.6. Caracterização física e química do vinho final

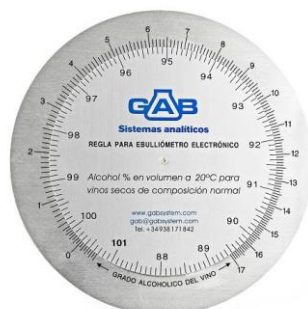
Para efetuar esta avaliação foram utilizadas metodologias para medição do pH, dos AR, da AT, da densidade, da acidez volátil (AV) e do título alcoométrico volúmico (TAV).

A medição do pH, dos AR, da AT e da densidade foi efetuada conforme descrito na secção 3.2.

Para a determinação da AV realizou-se uma destilação, na qual se ferveram 10 mL de amostra de cada vinho até ser possível recolher 100 mL de destilado. A estes acrescentou-se sete gotas de uma solução de fenolftaleína, procedendo-se depois a uma titulação recorrendo a uma solução 0,1 mol/L de NaOH. Estabelece-se o ponto de equilíbrio, quando se obtém uma cor rosada persistente durante, pelo menos, 30 s.

A fim de determinar o TAV, utilizou-se um ebuliómetro no qual foram colocadas as diversas amostras de vinho. Para efetuar a calibração do aparelho, utilizou-se água destilada cujo ponto de ebulição seria utilizado como referência para leitura do TAV num disco utilizado para o efeito. Após se efetuar a calibração, foram colocadas, uma por uma, as amostras do vinho no aparelho. Através do termómetro incorporado no aparelho, e após este estabilizar, registou-se a temperatura de ebulição da amostra. A cada temperatura de ebulição, e de acordo com a referência obtida através da leitura do ponto de ebulição da água destilada, foi possível obter o TAV de cada amostra através de um disco como o representado na Figura 9.

O último parâmetro registado para a caracterização física e química do vinho final foi a sua densidade, inicialmente medida à temperatura ambiente através de um termómetro analógico tipo vareta, e depois convertida para o valor de densidade a 20 °C. Para a medição da densidade, verteu-se o vinho para uma proveta, cerca de 300 mL onde se mergulhou o densímetro até à base da mesma e registando o valor obtido aquando da estabilização do mesmo.



**Figura 9.** Régua de medição do TAV

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização física e química do mosto

Como descrito na subsecção 3.2 antes dos tratamentos, os diferentes mostos utilizados foram caracterizados de acordo com o seu pH, a concentração de AR e ainda a sua densidade. A Tabela 4, apresenta as diferentes medições obtidas de cada amostra dos vários lotes de mosto utilizados. Destes lotes, os mostos A e B foram sujeitos à congelação, enquanto o C e D, trataram-se de mostos frescos, recolhido e armazenados na empresa durante o desenvolvimento do trabalho.

O que se pode observar pela Tabela 4 é que, nos parâmetros avaliados, a variabilidade entre os diversos mostos já se verifica, principalmente nos valores iniciais da concentração de AR. Não foi possível estudar a fundo a variação que existe entre os mostos congelados, no entanto o que se pode constatar a partir dos dados obtidos é que, entre estes e os mostos frescos, não existe uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Isto poderá estar associado ao facto de haver uma variabilidade grande na concentração inicial de AR, mas que carece de mais estudo. Esta variação, pode dever-se à deposição de partículas sólidas que ocorre aquando do descongelamento do mosto ou a fermentações espontâneas que ocorram antes das inoculações.

Os valores de condutividade elétrica demonstram uma proximidade entre todos os mostos, exceto o Mosto A. No entanto, e com os desvios apresentados a fazer com que os vários mostos sejam muito próximos, podemos concluir que o congelamento e descongelamento não influenciou este parâmetro assegurando a possibilidade de aplicação do tratamento elétrico.

**Tabela 4** - Caracterização dos mostos utilizados

	<b>Mosto A</b>	<b>Mosto B</b>	<b>Mosto C</b>	<b>Mosto D</b>
<b>pH</b>	3,18 ± 0,09	3,20 ± 0,05	3,09 ± 0,08	3,26 ± 0,07
<b>AR / (g/L)</b>	198,91 ± 49,49	234,71 ± 55,67	195,61 ± 65,44	291,69 ± 33,66
<b>Condutividade Elétrica</b>	2,27 ± 0,03	2,47 ± 0,15	2,55 ± 0,06	2,38 ± 0,10

Estes lotes foram divididos em vários volumes que serviriam depois para tratamento. Após os tratamentos foram também sujeitos a novas análises

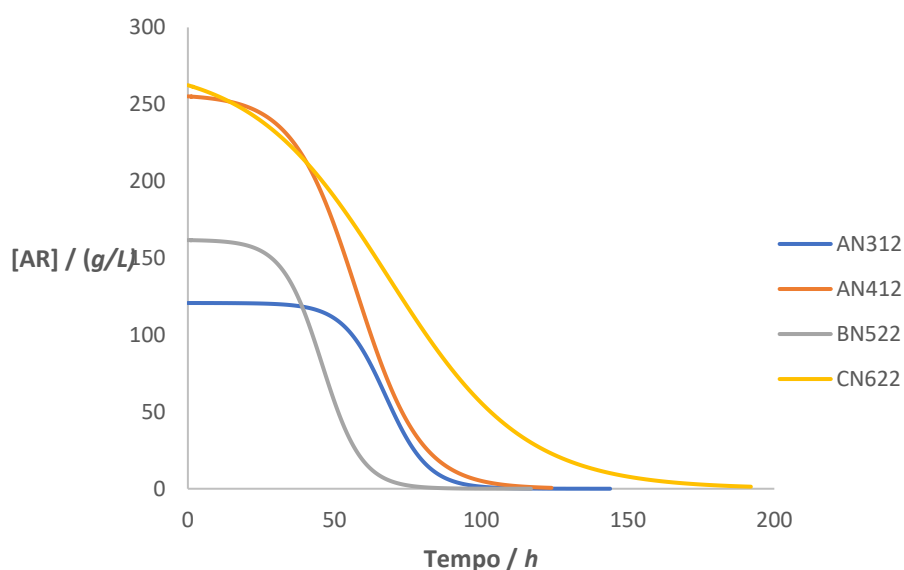


## 4.2. Variabilidade da amostra

Devido à utilização de quatro mostos diferentes, bem como a congelação de alguns deles, surgiram variações entre as análises iniciais, principalmente na quantificação dos AR. Esta variação pode dever-se à ocorrência de fermentações espontâneas antes dos tratamentos *óhmicos* terem sido aplicados ou devido à deposição de algumas partículas sólidas devido ao congelamento do mosto, tal como já foi referido na secção anterior.

Para simplificar a análise dos perfis de evolução da concentração de AR durante a fermentação foi utilizado o modelo cinético baseado na Equação 4 descrita na secção 3.2.

No gráfico da Figura 10. é possível observar a evolução da concentração de AR ao longo do tempo de fermentação em três lotes diferentes (A, B e C), que não foram sujeitos a tratamento. Estes foram utilizados, por sua vez, em três fermentações, também elas distintas (3, 4 e 5) e sob condições de fermentação variáveis devido à utilização dos dois tipos de inóculo de levedura considerados neste trabalho.

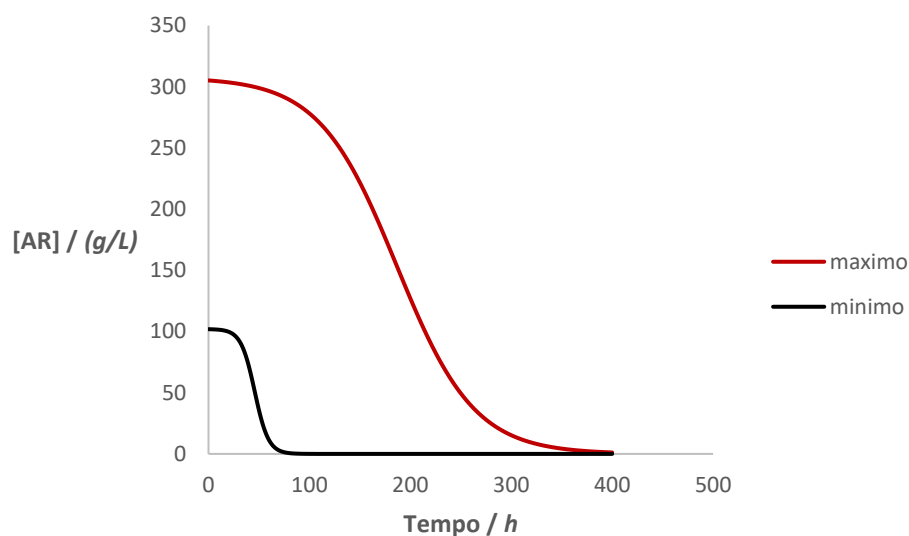


**Figura 10.** Gráfico representativo do perfil de evolução da concentração de AR ao longo do tempo de vários mostos, os quais estão descritos na legenda (códigos apresentados na Tabela 3).

Observando a Figura 10. percebe-se que existem dois problemas essenciais. O primeiro dos quais é relativo à diferença no teor inicial de AR dentro do mesmo lote e pode verificar-se pelas diferenças de concentração entre o mosto AN312 e o AN412. Apesar de se observar que após a fase de decréscimo

exponencial da concentração de AR estes assumem valores próximos, a diferença no valor inicial é muito visível neste gráfico. Da mesma forma, na utilização de mostos diferentes, mas sujeitos a condições de fermentação semelhantes, neste caso o mosto BN522 e CN622, observa-se um comportamento diferente entre eles na evolução da concentração de AR ao longo do tempo, bem como é possível reparar que a concentração de AR inicial é igualmente muito diferente.

Estes dois problemas associados e que mostram com clareza uma variabilidade das amostras, dificultaram uma comparação efetiva dos resultados obtidos. Neste sentido, sempre que possível, realizaram-se comparações entre cada lote e utilizou-se os limites da variação das amostras de controlo (não sujeitas a tratamento) como termo de comparação. Estes mesmos limites, representados pelo gráfico da Figura 11. foram definidos como coeficiente de variação de todos os mostos não tratados.



**Figura 11.** Limites dentro dos quais os perfis de evolução da concentração de AR das várias fermentações se devem encontrar.

Utilizando este coeficiente de variação, foi definido que todos os ensaios cuja evolução da concentração de AR se encontrem dentro destes limites, decorreram dentro daquilo que era expectável. Para além disso, é possível através deste coeficiente, perceber melhor, através de comparação gráfica imediata, se os efeitos das diversas variáveis em estudo são mais ou menos prejudiciais ao decorrer do processo fermentativo.

### 4.3. Otimização do inóculo

Uma das primeiras análises que se procurou levar a cabo foi a variabilidade da evolução das fermentações quando se utilizaram inóculos com concentrações de levedura diferentes. Isto teve como objetivo otimizar a utilização do inóculo de forma a perceber se era possível induzir uma melhoria processual com retorno a nível económico, devido a menor utilização de levedura selecionada. Para tal estudou-se a evolução da concentração de açúcares de três fermentações distintas, nas quais se aplicou a Inoculação 1 (0,10 g/L) em mostos não tratados, nomeadamente AN212, AN312 e AN412. Os parâmetros cinéticos destas fermentações encontram-se descritos na Tabela 5. Após a obtenção destes parâmetros, foram analisadas da mesma forma, duas fermentações também com mosto não tratado, mas inoculadas com o protocolo de Inoculação 2. Para tal usaram-se os mostos BN522 e o CN622. Os dados obtidos também se encontram na Tabela 5.

**Tabela 5** - Parâmetros cinéticos médios de fermentações sujeitas a Inoculação 1 e com mosto não tratado e de duas fermentações sujeitas a Inoculação 2

	<b>Inoculação 1</b>	<b>BN522</b>	<b>CN622</b>
<b>P / (g/L h)</b>	0,82 ± 0,08	0,89	0,44
<b>r / %</b>	92,3 ± 20,5	88,0	54,6
<b>Tempo de Fermentação / h</b>	96,3 ± 11,8	75,5	170,8
<b>X<sub>c</sub> / h</b>	55,8 ± 10,3	45,8	55,0
<b>k / h<sup>-1</sup></b>	-0,12 ± 0,02	-0,15	-0,04

Observando a tabelas e as duas fermentações modelo que se utilizaram para comparar a vantagem da inoculação, fica em aberto a possibilidade de a Inoculação 2 apresentar vantagem relativamente à 1 uma vez que a produtividade de fermentação dos mostos BN522 e CN622 se encaixa no intervalo entre a média e o desvio padrão apresentado para a Inoculação 1, já o rendimento, bem como o tempo de fermentação levanta algumas dúvidas uma vez que o mosto BN522 apresentou resultados prometedores e que permitiriam reduzir o tempo de fermentação, enquanto o mosto CN622 parece mostrar uma tendência negativa na avaliação destes dois parâmetros. No entanto, tal pode dever-se a uma fase exponencial de consumo de açúcares anormalmente baixa que pode estar associado a um controlo da temperatura ambiente (25 °C) menos bem conseguido.

Não sendo possível, desta forma, observar qualquer tendência favorável ou desfavorável da Inoculação 2, realizou-se uma comparação mais abrangente na qual se utilizaram diversos mostos

sujeitos aos dois tipos de tratamento e de concentração de inóculo, com o intuito de perceber se, independentemente das variáveis que se possam utilizar, o perfil cinético de fermentação obtido de em ambas as inoculações é significativamente diferente.

Os dados representados pela Tabela 6 mostram que vários parâmetros analisados apresentam desvios padrão elevados que se podem relacionar com a variabilidade das amostras, no entanto, entre as duas inoculações é possível perceber que todos os valores são semelhantes, não existindo diferenças significativas entre eles ( $p > 0,05$ ). Observa-se, por isso, que a utilização de uma menor quantidade de inóculo (Inoculação 2), mesmo que conjugada com as diversas variáveis a estudar, não contribui negativamente para o desenvolvimento da fermentação, tornando-se, assim, a mais favorável ao processo - uma menor concentração de inóculo utilizada para induzir a fermentação faz com que se utilize uma quantidade menor de levedura reduzindo, por conseguinte, os custos do processo de vinificação. Importa referir que os mostos utilizados para a caracterização da Inoculação 1 foram os AN212, AN312, AO312, AN412 e AP412, enquanto na Inoculação 2 se usaram os mostos AO322, AP422, BN522, CN622, CP622 e CO622.

**Tabela 6** - Comparação de parâmetros cinéticos médios da Inoculação 1 e 2

	<b>Inoculação 1</b>	<b>Inoculação 2</b>
<b>P / (g/L h)</b>	0,77 ± 0,10	0,68 ± 0,14
<b>r / %</b>	87,3 ± 18,4	76,9 ± 11,5
<b>Tempo de Fermentação / h</b>	105,5 ± 26,7	121,7 ± 30,0
<b>X<sub>c</sub> / h</b>	59,1 ± 10,6	64,3 ± 14,4
<b>k / h<sup>-1</sup></b>	-0,10 ± 0,03	-0,10 ± 0,03

Como tal, concluiu-se que, com base nesta premissa de vantagem económica, a inoculação com resultados mais promissores e que otimiza o processo fermentativo é a Inoculação 2.

#### **4.4. Efeito dos tratamentos óhmicos na cinética de fermentação**

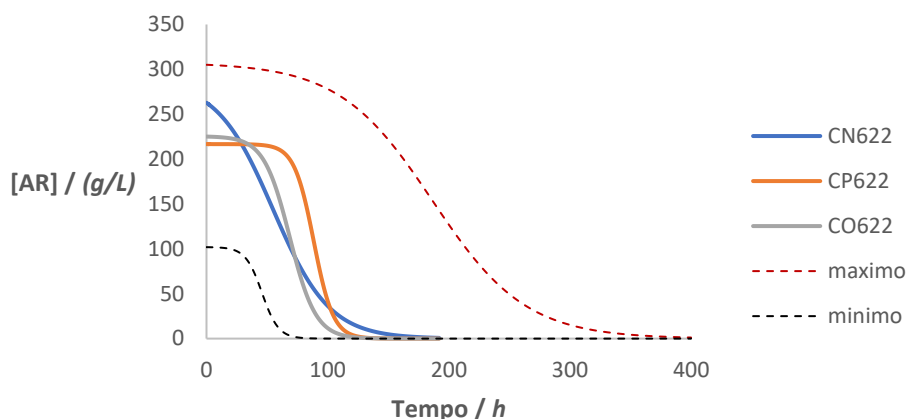
Após a caracterização física e química dos mostos, foi induzido o processo fermentativo nos diferentes lotes. Um dos passos essenciais, e até objetivo do trabalho, passou por observar se o tratamento aplicado ao mosto pode ter algum impacto negativo nas suas propriedades físicas e químicas com consequências inerentes no processo subsequente de fermentação.

A Figura 12. exemplifica a evolução da fermentação, realizada a temperatura ambiente, de mosto previamente tratado por OH. Para a avaliação foi determinada a concentração de AR ao longo do tempo de fermentação dos diferentes mostos - Controlo, *Óhmico 1* e *Óhmico 2*. Para esta análise foram utilizados os mostos CN622, CO622 e CP622 (consultar secção 3.5.) pertencentes ao mesmo lote (lote C).

Através desta abordagem foi possível avaliar as diferentes cinéticas de fermentação de acordo com os tratamentos aplicados. É possível observar que as três fermentações decorreram dentro dos limites considerados como expectáveis e, por isso, estamos perante comparações válidas. É evidente uma tendência no decréscimo na concentração de AR nas diferentes amostras, efeito que seria de esperar, tendo em conta que açúcares presentes no mosto serão o substrato necessário para a produção de etanol.

Para além do que foi referido anteriormente, pode observar-se que os mostos tratados, evidenciam uma fase estacionária, antes do decréscimo acentuado dos níveis de AR, muito superior à do mosto não tratado, no qual podemos considerar que esta fase nem se verifica. Este efeito pode dever-se à presença de leveduras indígenas do mosto o que permitem que a fermentação arranque mais rapidamente. Por outro lado, nos mostos tratados, nos quais a levedura inoculada poderá ser a única responsável pela fermentação, uma vez que o tratamento óhmico pode ter permitido a inativação das leveduras pré-existentes no mosto, de acordo com estudos previamente reportados (Dias, 2018) (Santos, 2019). Tal como já foi referido anteriormente, a levedura precisa de se multiplicar para poder consumir com mais eficácia os açúcares presentes no mosto, sendo que esta fase de multiplicação é traduzida pela fase estacionária que se observa nos gráficos do mosto CP622 e CO622.

É possível perceber, pela variação dos AR presentes no mosto, que as fermentações entre as diferentes amostras não são muito diferentes. O tempo que a fermentação demorou até que se atingissem valores de concentração de AR que permitem classificar a mesma como terminada (2 g/L (Ferreira, 2004)) variou bastante, com os mostos tratados a serem mais rápidos como é possível observar na Tabela 7. Os tratamentos *Óhmico 1* e *2*, tendencialmente, poderão induzir melhorias no tempo de fermentação. Nesta também estão representados os valores da produtividade e do rendimento de cada uma destas fermentações.



**Figura 12.** Evolução da concentração de AR em fermentações do mesmo mosto sujeito a três tratamentos diferentes. No gráfico estão representados os dados relativos ao Controlo (CN622), ao tratamento Óhmico 1 (CP622) e ao tratamento Óhmico 2 (CO622) representados, respetivamente, pelas cores azul, laranja e cinzento.

**Tabela 7 -** Valores de produtividade e eficiência de fermentação

	<b>P / (g/L h)</b>	<b>r / %</b>	<b>Tempo de Fermentação / h</b>
<b>CN622</b>	0,44	54,6	170,7
<b>CP622</b>	0,61	76,1	126,2
<b>CO622</b>	0,66	74,6	119,4

É possível perceber que tanto os valores de produtividade como os do rendimento de fermentação observados nos processos de vinificação também analisados na Figura 10, permitem sustentar que os tratamentos não influem negativamente o processo de fermentação levado a cabo, sugerindo uma tendência favorável à utilização do tratamento *Óhmico 1*, quando se analisam os valores do rendimento obtido. Relativamente aos tempos de fermentação, demonstram variações, com os tratados, genericamente, a serem mais rápidos.

Levando em conta as observações supracitadas, concluiu-se que os tratamentos óhmicos aplicados não influenciam negativamente a cinética de fermentação e, em alguns casos pontuais, até intervêm de forma positiva na mesma, validando assim a aplicação da tecnologia no que diz respeito a uma maior eficiência no processo fermentativo.

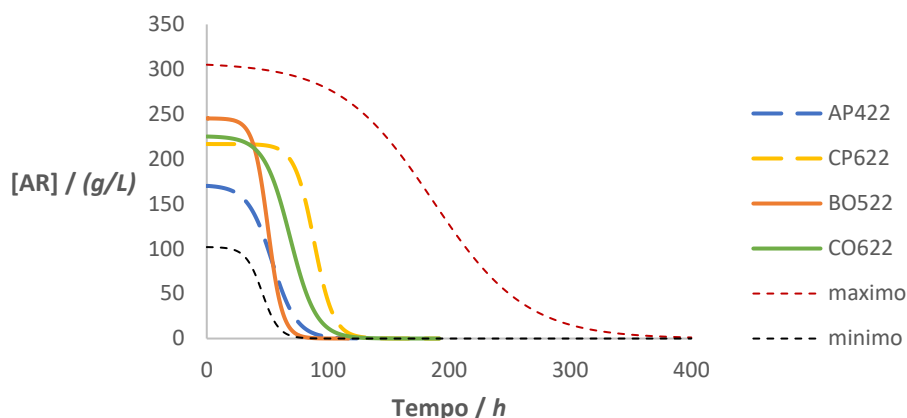
## 4.5. Comparação entre os dois tratamentos utilizados

A análise das variáveis descritas nas secções 4.2 e 4.3 foi realizada após validar a aplicação dos dois protocolos de tratamento óhmico, que não representaram efeitos negativos na fermentação, e ainda permitiram reduzir a quantidade de levedura inoculada em cada uma delas. Tornou-se, então, necessário definir a escolha do tratamento a efetuar para a produção de vinho.

É importante referir que o protocolo de tratamento *Óhmico 1* foi realizado tendo conta conclusões de trabalhos anteriores, que referem uma elevada eficiência na inativação de leveduras do mosto de vinho verde (Dias, 2018) (Santos, 2019). Com o tratamento *Óhmico 2* procurou-se assegurar igualmente a mesma inativação da levedura indígena do mosto, mas assegurando maior rapidez de tratamento (um pulso de temperatura), mantendo-se as temperaturas de tratamento inferiores a 70 °C, e procurando desta forma uma sinergia entre efeitos térmicos e elétricos na inativação microbiológica.

Na Figura 13., observam-se comparações entre fermentações levadas a cabo sob condições de temperatura ambiente. Nestas fermentações foram analisadas as evoluções de AR de dois tratamentos *Óhmico 1* (mosto AP422 e CP622) em comparação com dois mostos diferentes sujeitos ao tratamento *Óhmico 2* (mostos BO522 e CO622).

No gráfico da Figura 13., apesar de se observar, novamente, a grande variabilidade com que se lidou ao longo do trabalho, sendo que as concentrações iniciais de açúcares são muito díspares, em todo o caso os valores de AR obtidos indicam uma fermentação tendencialmente mais rápida quando se utiliza o tratamento *Óhmico 2* graças a uma fase exponencial de consumo de açúcares que inicia mais cedo ou que tem um declive mais acentuado, o que permite chegar mais rapidamente a valores considerados como o término da fermentação. Esta tendência é mais eviidente através da comparação entre AP422 e BO522, com a segunda fermentação a começar com uma concentração de AR mais elevada, mas a terminar em primeiro lugar. Apesar desta tendência, é possível observar que, quando se compara o mosto AP422 com o CO622, aquele que foi sujeito ao tratamento *Óhmico 2* não termina a fermentação mais cedo. No entanto, o ponto inicial da concentração de AR parece, contrariamente ao descrito na comparação anterior, ter influenciado bastante este perfil. Ainda assim, quando se compara os dois mostos tratados através do tratamento *Óhmico 2* ao mosto CP622, a tendência vantajosa deste tratamento é mais visível, com os dois mostos com maior concentração de AR a acabarem a fermentação mais cedo.



**Figura 13.** Evolução da concentração de AR ao longo de duas fermentações, sujeitas a temperatura ambiente. O tratamento *Óhmico 1* é representado pelas linhas azul e amarela enquanto o tratamento *Óhmico 2* é representado pelas linhas laranja e verde.

Para sustentar as observações do gráfico da Figura 13., foi elaborada a Tabela 8 na qual se evidenciam os valores médios obtidos para a produtividade, rendimento, o tempo de fermentação (considerando o primeiro momento em que se atingiu a concentração de AR igual a 2 g/L (Ferreira, 2004)), o ponto de inflexão da curva ( $x$ ) e o valor do declive da fase exponencial ( $k$ ).

**Tabela 8** - Comparação dos parâmetros cinéticos médios de mostos sujeitos aos dois tratamentos e fermentados a temperatura ambiente

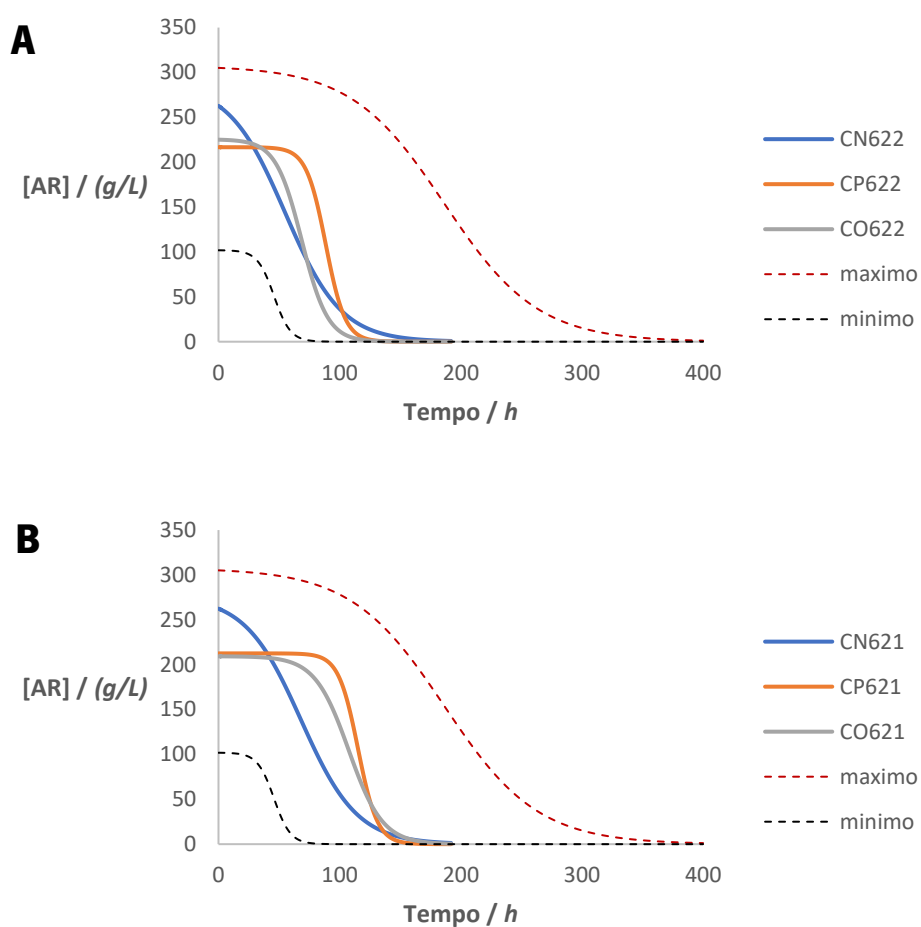
	<b>Tratamento <i>Óhmico 1</i></b>	<b>Tratamento <i>Óhmico 2</i></b>
<b>P / (g/L h)</b>	0,87 ± 0,28	0,88 ± 0,20
<b>r / %</b>	87,7 ± 9,6	74,5 ± 5,9
<b>Tempo de Fermentação / h</b>	100,1 ± 21,0	107,8 ± 23,0
<b><math>X_c</math> / h</b>	58,5 ± 22,9	59,7 ± 11,8
<b>k / h<sup>-1</sup></b>	-0,64 ± 0,74	-0,11 ± 0,03

Como se pode verificar, os parâmetros cinéticos médios dos mostos sujeitos aos dois tratamentos, apresentam valores próximos sem diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ) e que, apesar da tendência favorável do tratamento *Óhmico 2* sobre o *Óhmico 1* observável no gráfico da Figura 13., não se pode dizer com total certeza de que um apresenta total vantagem sobre o outro. A única exceção deve-se ao valor pouco realista de  $k$  obtido para o Tratamento *Óhmico 1* que torna a comparação, nesta



variável pouco fiável. Isto deve-se à utilização de um mosto cujos pontos obtidos são muito reduzidos, não permitindo que o modelo fizesse um ajuste da curva tão aproximado à realidade quanto era desejável.

Na Figura 14., apresentam-se, também, duas comparações entre fermentações sujeitas a temperatura ambiente e controlada, no gráfico 14A e 14B, respetivamente. Neste caso, a comparação foi feita através de mostos oriundos do mesmo lote. No gráfico A comparou-se a evolução de AR entre os mostos CN622, CO622 e CP622, por sua vez, no gráfico B, os mostos analisados foram os CN621, CO621 e CP621.



**Figura 14.** Evolução da concentração de AR durante duas fermentações sujeitas a temperatura ambiente (gráfico A) e temperatura controlada (gráfico B), cujo mosto de origem provém do mesmo lote. Estão representados a azul o Controlo, a laranja o tratamento Óhmico 1 e a cinzento o tratamento Óhmico 2.

Na Figura 14, podemos ver que os mostos CP622 e CO622 partem de concentrações iniciais de AR muito semelhantes, assim como os mostos CP621 e CO621. Nestes dois gráficos, em que se comparam perfis de concentração de AR de mostos do mesmo lote, a tendência discutida anteriormente que indicia uma vantagem do Óhmico 2 sobre o Óhmico 1 parece confirmar-se. Em ambos os casos a fermentação sujeita ao tratamento Óhmico 2 iniciou primeiro a sua fase exponencial de consumo de

açúcares, sendo visível que nas fermentações que decorreram a temperatura controlada o perfil do CP621 acaba por chegar aos valores finais ligeiramente mais cedo.

Para corroborar as observações realizadas através dos gráficos, foram definidos, através da Equação 8, os valores absolutos da taxa de crescimento da concentração de AR para diversas fermentações levadas a cabo após o tratamento *Óhmico 1* em contraponto com o *Óhmico 2*, para melhor se perceber as velocidades de fermentação de cada ensaio. Os valores obtidos podem ser observados na Tabela 10.

**Tabela 9** – Média das velocidades de fermentação de cada tratamento obtidas através do valor absoluto da taxa de consumo de AR.

	Tratamento <i>Óhmico 1</i>	Tratamento <i>Óhmico 2</i>
$\mu / s^{-1}$	1,20E-5 $\pm$ 0,16E-5	1,11E-5 $\pm$ 0,23E-5

Através da tabela anterior é possível confirmar que o tratamento *Óhmico 2*, contrariamente ao que é observado na evolução da concentração de AR ao longo do tempo, apresenta uma velocidade de fermentação ligeiramente inferior quando se comparam vários mostos, no entanto essa diferença não é significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparada ao tratamento *Óhmico 1*.

Através das Figuras 13 e 14 e das Tabelas 9 e 10, pode observar-se que, independentemente das variáveis estudadas, o tratamento *Óhmico 2* apresenta vantagens relativamente ao tratamento *Óhmico 1*, pelo facto do primeiro manter um perfil de fermentação esperado e muito semelhante ao segundo, não evidenciando efeitos negativos na capacidade do mosto concluir o processo fermentativo, e por ser igualmente mais rápido, – poupando tempo de tratamento (*Óhmico 2* demora 2 min a tratar 1 L de mosto ao passo que o *Óhmico 1* para a mesma quantidade demora 20 min) – o que é vantajoso em termos da economia de processo.

Quanto aos gráficos representados na Figura 14, o principal dado que se pode retirar é que, as vantagens descritas para o tratamento *Óhmico 2* se verificam quer as fermentações decorram a temperatura ambiente ou controlada.

Em suma, foi possível observar que não existiu qualquer prejuízo, quer na velocidade do processo fermentativo, quer na sua conclusão, devido à utilização do tratamento *Óhmico 2*. Tendo em conta estes resultados foi possível concluir que existe uma vantagem processual na utilização do tratamento *Óhmico 2*, devido, em grande parte, à diminuição do tempo de tratamento do mosto que é realmente significativa;

isto deve-se pelo facto de apenas ser necessário a aplicação de um pulso e não ser necessário aguardar o arrefecimento do mosto para aplicar novo pulso elétrico. Também se observaram certas diferenças nos produtos finais que serão descritas mais à frente. Neste sentido, concluiu-se que o tratamento *Óhmico 2* seria o mais promissor e, por conseguinte, o mais indicado a ser utilizado.

#### 4.6. Comparação entre diferentes temperaturas de fermentação

Como referido ao longo da secção 2, mais concretamente na subsecção 2.3.4, a temperatura é um dos fatores essenciais no desenvolvimento da fermentação. Foram então estudados os efeitos da temperatura de fermentação de mostos sujeitos à aplicação da inoculação e do tratamento considerados ideais, cujos dados cinéticos são representados pela Tabela 10. Os perfis de evolução da concentração de AR estão presentes na Figura 15.

Na Tabela 10 é possível comparar os habituais parâmetros cinéticos médios analisados entre fermentações levadas a cabo a temperatura ambiente (25 °C) e a temperatura controlada (15 °C).

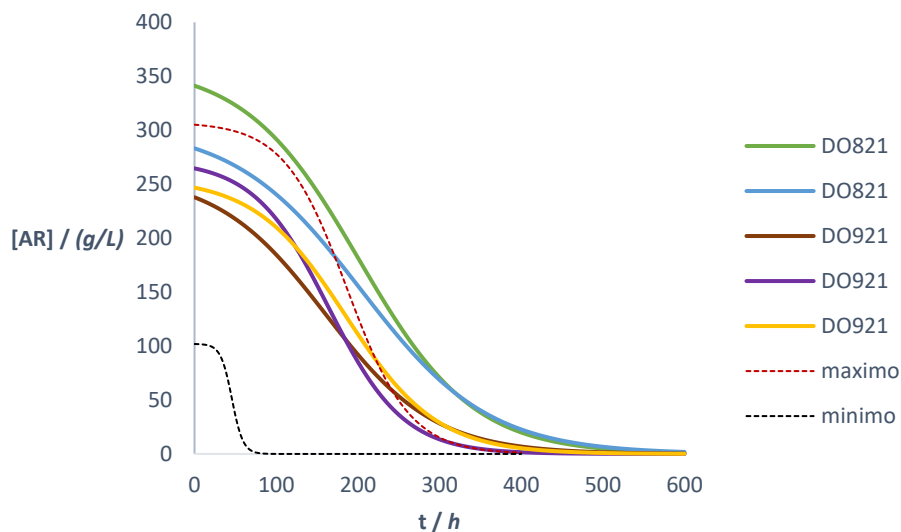
**Tabela 10** - Comparação dos parâmetros cinéticos médios de fermentações a temperatura ambiente e controlada

	<b>Temperatura Ambiente</b>	<b>Temperatura Controlada</b>
<b>P / (g/L h)</b>	0,88 ± 0,20	0,19 ± 0,03
<b>r / %</b>	74,5 ± 5,9	68,9 ± 7,6
<b>Tempo de Fermentação / h</b>	107,8 ± 23,0	497,9 ± 74,2
<b>X<sub>c</sub> / h</b>	59,7 ± 22,9	183,1 ± 18,2
<b>k / h<sup>-1</sup></b>	-0,11 ± 0,03	-0,02 ± 0,00

O que se pode observar na tabela são valores muito discrepantes ( $p < 0,05$ ) em praticamente todos os parâmetros cinéticos apresentados exceto no rendimento da fermentação. O tempo de fermentação a temperatura controlada, mais baixa do que a temperatura ambiente, é muito mais demorado tal como seria de esperar (Ferreira, 2004) (Mina and Tsaltas, 2013). Este facto faz com que, naturalmente, a produtividade das fermentações sujeitas a temperatura controlada, que depende diretamente do tempo que esta demora, seja mais baixa. Da mesma forma o ponto de inflexão da curva representativa do perfil de evolução dos AR irá ocorrer mais tardiamente, porque a fermentação é mais lenta e o consumo de açúcares mais demorado e, por último, o declive da fase exponencial do mesmo perfil também é menor. Tendo em conta que todos estes parâmetros se relacionam com o tempo de

fermentação e este é, como descrito pela bibliografia, mais demorado, estes resultados estão de acordo com o esperado inicialmente. O facto de o rendimento ser semelhante ( $p > 0,05$ ), entre as duas condições analisadas, é um fator relevante pois indica que apesar do descrito anteriormente, a conversão de AR em etanol não foi posta em causa.

No gráfico apresentado da Figura 15. é possível observar a evolução da concentração de AR ao longo de várias fermentações levadas a cabo sob temperatura controlada. Os mostos cujos perfis se podem observar nesse gráfico são os dois mostos DO821 e os três DO921. Esta figura mostra que apenas um dos mostos da fermentação 9 (roxo) se manteve durante quase toda a fermentação abaixo do limite definido como máximo, sendo possível considerar que a fermentação tem um perfil expectável. Isto mostra bem o quão diferentes, principalmente as fermentações DO821, são relativamente ao tempo de fermentação quando comparadas até com o limite máximo estabelecido. Sendo possível fazer esta observação, importa afirmar que apesar destas fermentações terem perfis que estão fora do máximo expectável, conseguiram atingir o seu término, apesar dos riscos associados a este tipo de condicionante que, tal como descrito na secção 2.3.4, podem induzir níveis muito elevados de etanol ou ácidos gordos de cadeia intermédia na fase final da fermentação, compostos que, como já foi citado, são tóxicos e prejudiciais à sua eficácia da fermentação pois podem precipitar o seu término.



**Figura 15.** Perfis de concentração de AR ao longo de várias fermentações sob temperatura controlada.

Pode afirmar-se que o trabalho permitiu clarificar que, tal como esperado, a fermentação sujeita a uma temperatura controlada foi mais lenta, mas conseguiu debelar os eventuais fatores de stress

associados e acima descritos, que esta variável apresenta, sendo sempre capaz de atingir o seu término. Conforme foi abordado na secção 2.3.4, a fermentação mais lenta potencia o desenvolvimento de compostos aromáticos o que pode contribuir para o desenvolvimento de um produto final diferenciado. Não se tendo observado a alteração do curso normal, para além do tempo de fermentação, em qualquer uma das fermentações sujeitas tanto aos pré-tratamentos elétricos como à redução da temperatura de fermentação, foi considerado que é possível classificar o processo fermentativo sujeito quando realizado às condições de temperatura controlada de 15 °C é vantajoso.

#### 4.7. Caracterização física e química do vinho final

Tendo em conta apenas os dados referentes às fermentações realizadas de acordo com aquelas que foram consideradas as condições ideais - utilização do tratamento *Óhmico 2*; inoculação 2 e temperatura controlada - foi elaborada uma tabela que resume os valores médios de densidade final, AT, AV e ainda o TAV obtidos dos vinhos fermentados sob as condições previamente descritas.

As fermentações consideradas para esta avaliação foram 6 e os parâmetros avaliados para cada uma encontram-se descritos na Tabela 11.

**Tabela 11** - Caracterização final dos vinhos obtidos através das fermentações levadas a cabo sob as "condições ideais"

<b>Código</b>	<b>Densidade a 20 °C</b>	<b>AT / (g/L)</b>	<b>AV / (g/L)</b>	<b>TAV % v/v</b>
<b>C0611</b>	994,1	8,0	0,24	9,9
<b>D0811</b>	990,1	5,9	0,48	12,0
<b>D0811</b>	990,3	5,9	0,54	12,0
<b>D0911</b>	990,5	6,4	0,60	12,0
<b>D0911</b>	990,1	6,0	0,42	11,3
<b>D0911</b>	990,3	5,9	0,36	11,3
<b>Média</b>	990,9 ± 1,4	6,3 ± 0,8	0,44 ± 0,1	11,4 ± 0,7
<b>Valores Referência</b>		> 4,5	< 1,08	[8,5;14,0]

É possível perceber pela tabela que as condições ideais permitiram obter vinhos muito semelhantes entre eles o que é verificado pelos baixos valores de desvio padrão entre as várias características analisadas. Por último, os vinhos analisados cuja média do TAV é de (11,4 ± 0,7) % vol.

está conforme o definido nas regras de produção e comercialização do Vinho Verde, assim como a acidez total e volátil. (CVRV, 2015) (Comissão Europeia, 2016)

Através desta análise é possível concluir que as fermentações realizadas sob condições consideradas ideais ao longo do trabalho como: utilização da Inoculação 2 (5 mL/L), utilização do pré-tratamento elétrico com recurso ao protocolo de tratamento *Óhmico 2* (1 pulso a 70 °C com 2 min de tempo total de tratamento) aliado a uma temperatura de fermentação controlada de cerca de 15 °C permite obter Vinhos Verdes com características físico-químicas consideradas legais dentro daquilo que é estabelecido pela CVRV.

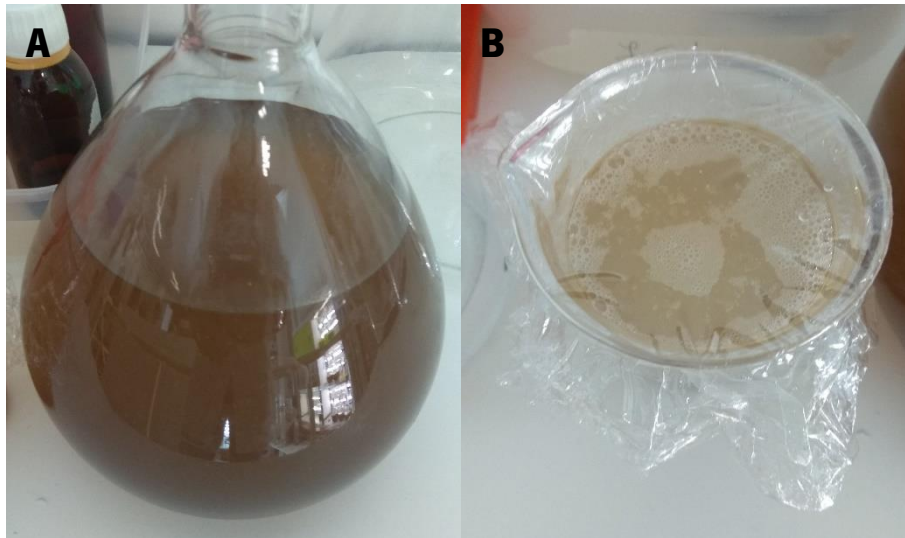
#### **4.8. Análise de estabilidade sem adição de sulfurosos**

A última secção de apresentação e discussão dos resultados refere-se a uma análise realizada com o intuito de garantir a estabilidade do mosto numa fase prévia à fermentação. Para tal, o mosto, após um primeiro tratamento *Óhmico 2*, foi mantido a temperatura ambiente durante 48h, ao fim das quais se repetiu o tratamento elétrico. Este procedimento foi repetido até ao mosto ter passado por quatro tratamentos ao longo de uma semana. No fim deste protocolo, o mosto foi inoculado com a Inoculação 2 e posto a fermentar a temperatura controlada (15 °C).

Ao fim deste protocolo de tratamento, foram registados os aspetos visuais do mosto sujeito aos tratamentos e de um não tratado, representados na Figura 16. pela imagem A e B, respetivamente.

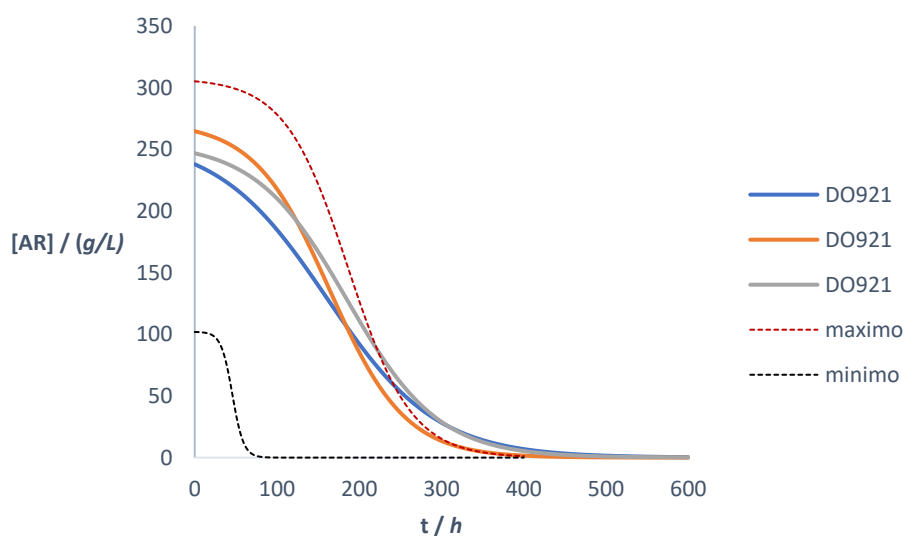
A Figura 16. mostra que o mosto sujeito aos tratamentos periódicos se encontra estável e sem qualquer indício de que possa ter ocorrido uma fermentação espontânea induzida por leveduras indígenas. Já a imagem B, representativa do mosto não tratado, mostra um mosto com um borbulhar acentuado, que já se verificava a partir das 48 h desde o início do ensaio, sinal de que as leveduras presentes no mosto, não foram eliminadas por qualquer tratamento, foram capazes de induzir uma fermentação espontânea.

Esta observação indicia que a estratégia adotada de tratamento assegurou a estabilidade do mosto a temperatura ambiente durante pelo menos uma semana, sem adição de qualquer tipo de compostos sulfurosos. Para além da verificação da possibilidade de manter o mosto estável sem a adição de sulfurosos, importa perceber se, sendo sujeito a este protocolo, o mosto segue uma fermentação dentro do esperado. Na Figura 17. encontram-se os perfis da concentração de AR ao longo do tempo de três fermentações feitas com mostos aos quais se aplicou o protocolo descrito.



**Figura 16.** Aspeto do mosto ao fim de uma semana; A representa o mosto sujeito aos vários tratamentos e B representa o mosto não tratado.

O que se pode observar é que as três fermentações decorreram dentro dos limites daquilo que era expectável para todos os ensaios realizados. Percebe-se ainda, que tal como na secção 4.6, as fermentações são muito prolongadas no tempo devido à temperatura de fermentação ser de 15 °C, temperatura que em todo o caso não compromete o processo fermentativo, contornando os problemas descritos na bibliografia, como por exemplo a concentração elevada de etanol que pode precipitar o término da fermentação sem que o substrato seja consumido na sua totalidade (Ferreira, 2004) (Mina and Tsaltas, 2013).



**Figura 17.** Perfis de concentração de AR ao longo das fermentações com mostos sujeitos ao protocolo de tratamento de estabilidade

Perante estes resultados é possível concluir que os indícios são prometedores e esta hipótese deve ser alvo de estudo mais aprofundado. Um tratamento continuado ao longo do processo de armazenamento sob condições refrigeradas, poderá estabilizar o mosto sem a necessidade de adição de sulfuroso.



## 5. Conclusão

O trabalho realizado permitiu concluir que a introdução da etapa de tratamento através de OH permitiu obter resultados promissores a nível económico e processual na produção de Vinho Verde. Também as diversas variáveis em estudo mostraram ser vantajosas relativamente ao processo tradicional.

As análises químicas ao trabalho foram dificultadas pelas diferentes concentrações iniciais de AR, tendo sido necessário recorrer a um modelo matemático que permitisse balizar o que seriam fermentações consideradas expectáveis ou não.

Com o estudo da otimização do inóculo, foi possível reduzir em 50% a utilização da levedura necessária para inocular 1 L de mosto. Desta forma, percebeu-se que, com a utilização de uma inoculação de 5 mL/L, é possível obter uma fermentação normal e que chega ao seu término. Isto permitiu encontrar uma vantagem económica no processo.

Analisando as fermentações sujeitas, quer ao tratamento convencional de 3 pulsos elétricos, quer as fermentações sujeitas ao tratamento de apenas 1 pulso, foi possível concluir que não existiram diferenças significativas na cinética de fermentação entre elas. Concluiu-se, assim, que, devido ao tempo de o tratamento de 1 pulso ser inferior, este tratamento induz uma vantagem processual.

Por último, apesar das dificuldades que temperatura baixa de fermentação induz no processo, concluiu-se que as fermentações sujeitas a temperaturas de fermentação de cerca de 15 °C conseguiram atingir o seu término, com produtividades muito mais reduzidas, mas com níveis de rendimento semelhantes às fermentações que decorreram a temperatura ambiente. Esta é também uma vantagem processual devido às características organoléticas que o produto final adquire.

Os vinhos produzidos através das condições consideradas como ideais apresentaram um TAV de  $11,4 \pm 0,7$  % (v/v), uma AT de  $6,3 \pm 0,8$  e AV de  $0,44 \pm 0,1$ . Todos estes parâmetros se encontram dentro dos limites de qualidade definidos, provando assim que, as condições recomendadas são viáveis e produzem vinhos dentro dos parâmetros de qualidade.

Por fim, não foi possível definir com clareza a estabilidade microbiana que o tratamento induz no mosto, sem que fosse necessário adicionar sulfurosos ao mesmo. No entanto, as perspetivas são promissoras e é aconselhável continuar a estudar esta possibilidade, de forma a tornar o processo ainda mais interessante tanto a nível económico como processual.

## Bibliografia

ANADIL – Comércio Geral e Importação S.A., “Acidímetro CAZENAVE – Instruções”.

Alcántara-Zavala, Alejandra E., Figueroa-Cárdenas, Juan de Dios, Morales-Sánchez, Eduardo, Aldrete-Tapia, Jesús A., Arvizu-Medrano, Sofía M. and Martínez-Flores, Héctor E.. 2019. “Application of Ohmic Heating to Extend Shelf Life and Retain the Physicochemical, Microbiological, and Sensory Properties of Pulque.” *Food and Bioprocess Processing* 118: 139–48. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.09.007>.

Carrau, Francisco, Medina, Karina, Fariña, Laura, Boido, Eduardo and Dellacassa, Eduardo. 2010. “Effect of *Saccharomyces Cerevisiae* Inoculum Size on Wine Fermentation Aroma Compounds and Its Relation with Assimilable Nitrogen Content.” *International Journal of Food Microbiology* 143 (1–2): 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.024>.

CVRVW. 2005. *Requisitos Organolépticos Mínimos Dos Produtos Vinicos Da Região Demarcada Dos Vinhos Verdes Para a Obtenção e Controlo Das Denominações de Origem e Do Vinho Regional Minho*

CVRVW. 2015. “Portaria n.º 152/2015, de 26 de Maio.”

CVRVW. (2021). Vinho Verde - Sobre o Vinho Verde. Retrieved from <https://www.vinhoverde.pt/pt/sobre-o-vinho-verde>

CVRVW. (2021). Vinho Verde - Como se Faz o Verde. Retrieved from <https://www.vinhoverde.pt/pt/como-se-faz-o-verde>

Demirdöven, Aslihan and Baysal, Taner. 2015. “Effects of Electrical Pre-Treatment and Alternative Heat Treatment Applications on Orange Juice Production and Storage.” *Food and Bioprocess Processing* 94 (August 2012): 443–52. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.06.004>.

Dias, J. 2018. “Avaliação de processos alternativos de inativação de leveduras de decomposição do vinho.” Tese (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho. Braga, p.89.

Europeia, Comissão. 1990. “Regulamento (CEE) N° 2676/90 da Comissão.” *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*.

Europeia, Comissão. 2009. "Regulamento (CE) N° 607/2009 da Comissão." *Jornal Oficial Da União Europeia*

Europeia, Comissão. 2016. “Regulamento Delegado (UE) 2016/128 da Comissão.” *Jornal Oficial Da União Europeia*

Ferreira, Jacques. 2004. “Factors influencing the fermentation performance of commercial wine yeasts.” Thesis (Master of Agricultural Science) - Stellenbosch University. South Africa, p.75.

Ferrer-Gallego, R., Puxeu, M., Martín, L., Nart, E., Hidalgo, C. and Andorrà, I. 2016. “Microbiological, Physical, and Chemical Procedures to 2 Elaborate High-Quality SO<sub>2</sub>-Free Wines.” *Intech*, 171–93.

Garcia, P. 2019. “A mediatização do vinho: revitalização do casteldo de Mourão – Adega e museu como articuladores entre o património e o vinho.” Tese (Mestrado em Arquitetura) - Faculdade de Arquitetura, Universidade de Lisboa. Lisboa, p.245.

Garde-Cerdán, T., Arias-Gil, M., Marsellés-Fontanet, A.R., Ancín-Azpilicueta, C. and Martín-Belloso, O. 2007. “Effects of Thermal and Non-Thermal Processing Treatments on Fatty Acids and Free Amino Acids

of Grape Juice." *Food Control* 18 (5): 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.12.004>.

Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A.R., Arias-Gil, M., Ancín-Azpilicueta, C. and Martín-Belloso, O. 2008a. "Effect of Storage Conditions on the Volatile Composition of Wines Obtained from Must Stabilized by PEF during Ageing without SO<sub>2</sub>." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9 (4): 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.05.002>.

Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A.R., Arias-Gil, M., Ancín-Azpilicueta, C., and Martín-Belloso, O. 2008b. "Influence of SO<sub>2</sub> on the Evolution of Volatile Compounds through Alcoholic Fermentation of Must Stabilized by Pulsed Electric Fields." *European Food Research and Technology* 227 (2): 401–408. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0734-5>.

Guarinello, Norberto Luiz. 1997. "A Civilização Do Vinho: Um Ensaio Bibliográfico." *Anais Do Museu Paulista: História e Cultura Material*. <https://doi.org/10.1590/s0101-47141997000100009>.

Gutierrez, L.E. 1993. "Produção de Álcoois Superiores Por Linhagens de Saccharomyces Durante a Fermentação Alcoólica." *Scientia Agricola* 50 (3): 464–72. <https://doi.org/10.1590/s0103-90161993000300021>.

Horsey, I. (2007). *The Chemistry and Biology of Winemaking*. The Royal Society of Chemistry.

IVV. 2020. "ABC Do Setor Vitivinícola." *Instituto Da Vinha e Do Vinho*. <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/499>.

Jackson, R. (2008). *Wine Science - Principles and Applications (Third)*. Elsevier.

König, H., Unden, G., & Fröhlich, J. (Eds.). (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-30). Heidelberg: Springer.

Machado, Luís F., Pereira, Ricardo N., Martins, Rui C., Teixeira, José A., and Vicente, António A. 2010. "Moderate Electric Fields Can Inactivate Escherichia Coli at Room Temperature." *Journal of Food Engineering* 96 (4): 520–27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.035>.

Mina, M., and D. Tsaltas. 2013. "Contribution of Yeast in Wine Aroma and Flavour." *Intech*, 117–34. <http://www.intechopen.com/books/trends-in-telecommunications-technologies/gps-total-electron-content-ec-prediction-at-ionosphere-layer-over-the-equatorial-region%0AInTec%0Ahttp://www.asociatiamhc.ro/wp-content/uploads/2013/11/Guide-to-Hydropower.pdf>.

Pataro, Gianpiero, Barca, Giuseppe M.J., Pereira, Ricardo N., Vicente, António A., Teixeira, José A., and Ferrari, Giovanna. 2014. "Quantification of Metal Release from Stainless Steel Electrodes during Conventional and Pulsed Ohmic Heating." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 21: 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.11.009>.

Pereira, Ricardo N., and Vicente, António A. 2010. "Environmental Impact of Novel Thermal and Non-Thermal Technologies in Food Processing." *Food Research International* 43 (7): 1936–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.013>.

Pereira, Ricardo N., Coelho, Marta I., Genisheva, Zlatina, Fernandes, Jean Michel, Vicente, António A., Pintado, Manuela E. and Teixeira, José A. 2020. "Using Ohmic Heating Effect on Grape Skins as a Pretreatment for Anthocyanins Extraction." *Food and Bioproducts Processing* 124: 320–28. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.09.009>.

Pereira, Ricardo N., Martins, J., Mateus, C., Teixeira, José A. and Vicente, António A. 2006. "Death

Kinetics of Escherichia Coli in Goat Milk and Bacillus Licheniformis in Cloudberry Jam Treated by Ohmic Heating." In *33rd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, 1–8.

Pinto, Cátia, Pinho, Diogo, Cardoso, Remy, Custódio, Valéria, Fernandes, Joana, Sousa, Susana, Pinheiro, Miguel, Egas, Conceição and Gomes, Ana C. 2015. "Wine Fermentation Microbiome: A Landscape from Different Portuguese Wine Appellations." *Frontiers in Microbiology* 6 (SEP): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00905>.

Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J. and Álvarez, I. 2009. "Pulsed Electric Fields Inactivation of Wine Spoilage Yeast and Bacteria." *International Journal of Food Microbiology* 130 (1): 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.035>.

Puértolas, E., Saldaña, G., Álvarez, I., and Raso, J. 2011. "Experimental Design Approach for the Evaluation of Anthocyanin Content of Rosé Wines Obtained by Pulsed Electric Fields. Influence of Temperature and Time of Maceration." *Food Chemistry* 126 (3): 1482–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.164>.

Puértolas, E., Henández-Orte, Purificación, Saldaña, Guillermo, Álvarez, Ignacio, and Raso, Javier. 2010. "Improvement of Winemaking Process Using Pulsed Electric Fields at Pilot-Plant Scale. Evolution of Chromatic Parameters and Phenolic Content of Cabernet Sauvignon Red Wines." *Food Research International* 43 (3): 761–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.11.005>.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006a). *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition*. Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition (Vol. 2).

Rocha, Cristina M.R., Genisheva, Zlatina, Ferreira-Santos, Pedro, Rodrigues, Rui, Vicente, António A., Teixeira, José A., and Pereira, Ricardo N. 2018. "Electric Field-Based Technologies for Valorization of Bioresources." *Bioresource Technology* 254 (January): 325–39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.068>.

Santos, A. 2019. "Estabilização Das Leveduras Do Mosto de Uvas Através Da Tecnologia de Aquecimento Ôhmico." Tese (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho. Braga, p.91.

Santos, Mickael C., Nunces, Cláudia, Saraiva, Jorge A. and Coimbra, Manuel A. 2012. "Chemical and Physical Methodologies for the Replacement/Reduction of Sulfur Dioxide Use during Winemaking: Review of Their Potentialities and Limitations." *European Food Research and Technology* 234 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1614-6>.

Sipos, A. 2016. "Current State and Perspective in the Models Applicable to Oenology." *Intech*, 143–69.

Speers, A., Bendiak, D., Caudill, J., Cook, D., Eck, S. E., Fernandez B., Gibson, B., *et al.* 2010. "Miniature Fermentation Method." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 68 (4): 231–37. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2010-0929-01>.

Thomas, D, and Surdin-Kerjan, Y. 1997. "Metabolism of Sulfur Amino Acids in Saccharomyces Cerevisiae." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (4): 503–32. <https://doi.org/10.1128/mnbr.61.4.503-532.1997>.

Wang, Lang Hong, Pyatkovskyy, Taras, Yousef, Ahmed, An Zeng, Xin and Sastry, Sudhir K.. 2020. "Mechanism of Bacillus Subtilis Spore Inactivation Induced by Moderate Electric Fields." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 62 (March): 102349.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102349>.

Wine in Moderation. (2020). Wine in Moderation - Cultura do Vinho. Retrieved from <https://www.wineinmoderation.eu/pt/Cultura>

Wine in Moderation. (2020). Wine in Moderation - História e Tradição do Vinho. Retrieved from <https://www.wineinmoderation.eu/pt/cultura/historia-e-tradicao-do-vinho>

Wu, Shilin, Yang, Na, Jin, Yamei, Xu, Xueming, Jin, Zhengyu and Xie, Zhengjun. 2020. "Effects of Induced Electric Field (IEF) on the Reduction of *Saccharomyces Cerevisiae* and Quality of Fresh Apple Juice." *Food Chemistry* 325 (January): 126943. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126943>.

## Anexos

### Anexo I

**Tabela 12** - Parâmetros cinéticos de todos os mostos analisados

Código	P / (g/L h)	r / %	Tempo de Fermentação / h	X <sub>c</sub> / h	k / h'
AN212	0,82	73,1	81,5	42,4	-0,12
AP212	1,14	101,7	74,8	63,1	-0,37
AP222	1,26	98,7	74,8	33,1	-1,69
AN312	0,71	120,8	97,1	67,4	-0,14
A0312	0,66	81,1	153,3	69,0	-0,06
A0322	0,73	80,4	138,9	73,8	-0,08
AN412	0,92	83,1	110,4	57,6	-0,09
AP412	0,72	78,4	85,3	48,8	-0,12
AP422	0,73	89,1	99,2	54,0	-0,10
BN522	0,89	88,0	75,5	45,8	-0,15
B0522	1,15	78,4	79,5	50,6	-0,17
B0522	0,98	65,2	93,4	42,6	-0,10
CN622	0,44	54,6	170,8	55,0	-0,04
CN621	0,44	61,1	182,4	68,2	-0,04
C0622	0,66	73,9	119,5	68,8	-0,09
C0621	0,46	79,6	172,6	107,5	-0,07
CP622	0,61	75,3	126,2	88,5	-0,12
CP621	0,51	77,3	152,6	115,2	-0,12
CN721	0,28	66,2	115,0	78,3	-0,11
C0721	0,26	57,0	120,4	82,5	-0,11
C0721	0,24	56,3	126,8	83,8	-0,09
DN821	0,25	67,6	362,5	186,8	-0,03
DN821	0,24	60,8	374,8	177,8	-0,03
D0821	0,17	55,9	564,7	201,3	-0,01
D0821	0,16	66,3	595,1	204,1	-0,01
D0921	0,20	77,9	483,7	160,4	-0,02
D0921	0,23	69,9	390,1	164,0	-0,02
D0921	0,20	74,4	455,7	185,3	-0,02

## Anexo II

**Tabela 13** - Médias, desvios padrão e teste estatístico para otimização do inóculo

Código	P / (g/L h)	r / %	Tempo de Fermentação / h	X <sub>c</sub> / h	k / h <sup>-1</sup>
AN212	0,82	73,1	81,5	42,4	-0,12
AN312	0,71	120,8	97,1	67,4	-0,14
AN412	0,92	83,1	110,4	57,6	-0,09
<b>Média</b>	<b>0,82</b>	<b>92,3</b>	<b>93,6</b>	<b>55,8</b>	<b>-0,12</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,08</b>	<b>20,5</b>	<b>11,8</b>	<b>10,3</b>	<b>0,02</b>
AN212	0,82	73,1	81,5	42,4	-0,12
AN312	0,71	120,8	97,1	67,4	-0,14
A0312	0,66	81,1	153,3	69,0	-0,06
AN412	0,92	83,1	110,4	57,6	-0,09
AP412	0,72	78,4	85,3	48,8	-0,12
<b>Média</b>	<b>0,77</b>	<b>87,3</b>	<b>105,5</b>	<b>59,1</b>	<b>-0,10</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,10</b>	<b>18,4</b>	<b>26,7</b>	<b>10,6</b>	<b>0,03</b>
A0322	0,73	80,4	138,9	73,8	-0,08
AP422	0,73	89,1	99,2	54,0	-0,10
BN522	0,89	88,0	75,5	45,8	-0,15
CN622	0,44	54,6	170,8	55,0	-0,04
CP622	0,61	75,3	126,2	88,5	-0,12
C0622	0,66	73,9	119,5	68,8	-0,09
<b>Média</b>	<b>0,68</b>	<b>76,9</b>	<b>121,7</b>	<b>64,3</b>	<b>-0,10</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,14</b>	<b>11,5</b>	<b>29,9</b>	<b>14,3</b>	<b>0,03</b>
<b>Teste Estatístico</b>					
<b>Teste F</b>	0,475	0,387	0,836	0,570	0,772
<b>Teste T / p</b>	<b>0,152</b>	<b>0,153</b>	<b>0,207</b>	<b>0,207</b>	<b>0,353</b>

### Anexo III

**Tabela 14** - Médias, desvios padrão e teste estatístico para comparação entre tratamentos

<b>Código</b>	<b>P / (g/L h)</b>	<b>r / %</b>	<b>Tempo de Fermentação / h</b>	<b>X<sub>c</sub> / h</b>	<b>k / h<sup>-1</sup></b>
AP222	1,26	98,7	74,8	33,1	-1,69
AP422	0,73	89,1	99,2	54,0	-0,10
CP622	0,61	75,3	126,2	88,5	-0,12
<b>Média</b>	<b>0,87</b>	<b>87,7</b>	<b>100,1</b>	<b>58,5</b>	<b>-0,64</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,28</b>	<b>9,6</b>	<b>21,0</b>	<b>22,8</b>	<b>0,74</b>
A0322	0,73	80,4	138,9	73,8	-0,08
B0522	1,15	78,4	79,5	50,6	-0,17
B0522	0,98	65,2	93,4	42,6	-0,10
C0622	0,66	73,9	119,5	68,8	-0,09
<b>Média</b>	<b>0,88</b>	<b>74,5</b>	<b>107,8</b>	<b>59,7</b>	<b>-0,11</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,20</b>	<b>5,9</b>	<b>23,0</b>	<b>11,8</b>	<b>0,03</b>
<b>Teste Estatístico</b>					
<b>Teste F</b>	0,487	0,384	0,965	0,269	0,000
<b>Teste T / p</b>	<b>0,476</b>	<b>0,057</b>	<b>0,357</b>	<b>0,471</b>	<b>0,142</b>



## Anexo IV

**Tabela 15** - Médias, desvios padrão e teste estatístico para comparação entre temperaturas de fermentação

Código	P / (g/L h)	r / %	Tempo de Fermentação / h	X <sub>c</sub> / h	k / h <sup>-1</sup>
A0322	0,73	80,4	138,9	73,8	-0,08
B0522	1,15	78,4	79,5	50,6	-0,17
B0522	0,98	65,2	93,4	42,6	-0,10
C0622	0,66	73,9	119,5	68,8	-0,09
<b>Média</b>	<b>0,88</b>	<b>74,5</b>	<b>107,8</b>	<b>59,7</b>	<b>-0,11</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,20</b>	<b>5,9</b>	<b>23,0</b>	<b>11,8</b>	<b>0,03</b>
D0821	0,17	55,9	564,7	201,3	-0,01
D0821	0,16	66,3	595,1	204,1	-0,01
D0921	0,20	77,9	483,7	160,4	-0,02
D0921	0,23	69,9	390,1	164,0	-0,02
D0921	0,20	74,4	455,7	185,3	-0,02
<b>Média</b>	<b>0,19</b>	<b>68,9</b>	<b>497,8</b>	<b>183,0</b>	<b>-0,02</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,03</b>	<b>7,6</b>	<b>74,2</b>	<b>18,2</b>	<b>0,00</b>
<b>Teste Estatístico</b>					
<b>Teste F</b>	0,002	0,737	0,091	0,537	0,000
<b>Teste T / p</b>	<b>0,004</b>	<b>0,160</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,009</b>