

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Nanofiltração na produção de vinhos: Redução de acidez volátil e de
compostos fenólicos indesejados.**

Ana Rita Maia Caramelo

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sobre a orientação de:

Professor Raul José Jorge de Barros

Engenheiro Mário Jorge Caldeira Andrade

2014

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologias

Nanofiltração na produção de vinhos: Redução de acidez volátil e de compostos fenólicos indesejados.

Ana Rita Maia Caramelo

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sobre a orientação de:

Professor Raul José Jorge de Barros

Engenheiro Mário Jorge Caldeira Andrade

2014

Nanofiltração na produção de vinhos: Redução de acidez volátil e de compostos fenólicos indesejados.

Declaração de autoria do trabalho

“Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.”

“ A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

“Quando você realmente deseja uma coisa, todo o universo conspira a seu favor.”

Paulo Coelho

“O sucesso na vida, muito depende da insistência e ação”

Ralph Waldo Emerson

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar a onde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz”

Bill Gates

Dedicatória e Agradecimentos

Concluída a elaboração do presente trabalho, quero agradecer formalmente a determinadas pessoas que estiveram presentes e tornaram possível a concretização de um sonho. Quero agradecer a todos o tempo perdido comigo, mesmo em situações de maior tensão, sem os quais este trabalho não seria uma realidade.

Com isto quero agradecer:

Ao Professor Doutor Raul José Jorge de Barros, pela sua disponibilidade em ter aceitado este trabalho como meu orientador interno, pela sua dedicação e ensinamentos transmitidos ao longo do meu curso.

Ao Engenheiro Mário Jorge Caldeira Andrade, meu orientador externo, pela sua dedicação, disponibilidade, orientação deste trabalho e sobretudo pela sua fácil acessibilidade a quem trabalha consigo.

Aos meus amigos e colegas de curso, em especial, Ana Isabel Vieira, Carina Silva, Ana Nunes, Ana Pereira, Tiago Fernandes, António Canavarro e Vânia João, por me terem apoiado, ajudado e incentivado na fase final deste trabalho. Mas sobretudo obrigada por no decorrer destes longos anos de curso terem feito com que a distancia da minha casa parecesse curta e terem-se tornado também uma segunda família. Obrigada por teres estado presentes nos momentos de maior loucura bem como nos de desespero.

Aos meus amigos de longa data, que mesmo com a distância permitiram que a nossa amizade continuasse a mesma. Obrigada por mesmo longe partilharem a vossa vida comigo.

A Vanessa Pereira, minha melhor amiga, um obrigada especial por todo o carinho, incentivo, pela palavra certa no momento certo, pela companhia (por telefone) na tarde de sábado ou na manhã de domingo quando me encontrava sozinha. Não preciso de referir mais, tu sabes o quanto te agradeço.

A minha família por me terem incentivada no decorrer da minha vida. O meu obrigada por estarem sempre prontos para me ouvir e ajudar.

A minha irmã e cunhado pela paciência e carinho nestes últimos anos, e pela sua visita sempre que possível. Por fazerem questão de sempre que fosse a casa ir a vossa casa jantar e por todas as semanas me ligarem.

À minha tia, Teresa por me apoiar e por ter contribuído sempre que possível durante estes anos. Obrigada pelo carinho partilhado.

Aos meus Pais, a quem dedico este trabalho, pela eterna paciência e apoio ao longo do curso e de toda a minha vida. Obrigada pelo esforço e dedicação para que fosse possível, hoje estar a realizar esta etapa. Sobretudo à minha mãe, pelas horas de conversa ao telefone, entre risos e choro, que tornaram a distância relativamente curta.

Ao João, por todo apoio e paciência incondicional e fundamental durante estes anos. Por todo o amor, carinho e dedicação, que fizeram com que esta minha realização pessoal chega-se ao sucesso sem nunca olha para trás. Obrigado por manteres a minha “sanidade mental” e por transformares os momentos de choro em gargalhadas.

A todos o meu sincero e profundo agradecimento. OBRIGADA!

Resumo

Na indústria vinícola existem uma série de parâmetros que devem ser monitorizados e controlados, de forma a garantir a qualidade dos vinhos. Algumas das preocupações atuais são a presença de fenóis voláteis (4-etilfenol e 4-etilguaiacol) que originam aromas a “couro” ou “suor de cavalo”, bem como a existência de acidez volátil elevada.

No caso dos fenóis voláteis, a presença destes está associada à atividade das leveduras *Brettanomyces/Dekkera*, uma vez que os vinhos onde surgem permanecem durante um longo período de tempo sem sofrerem clarificação, filtrações ou tratamentos, mantendo assim elevadas concentrações de aromas, pigmentos e coloides. Estes vinhos com uma elevada estrutura e concentração, aliadas a valores de pH elevados e baixos valores de SO₂ molecular são propícios ao desenvolvimento microbiano. Além disso, o seu estágio em barricas de madeira, de higienização difícil e elevado aporte de oxigénio, facilita também o crescimento microbiano.

Relativamente à acidez volátil (devido ao ácido acético) quando atinge certos limites, confere ao vinho um sabor acre ou azedo e um aroma indesejável a vinagre, o que faz com que o vinho seja impróprio para consumo. O ácido acético pode ser formado ainda antes da fermentação alcoólica nas uvas infetadas com *Botrytis cinerea*, ou por leveduras de contaminação durante a fermentação alcoólica e ainda pelas bactérias acéticas durante o estágio do vinho.

Com o objetivo de reduzir os fenóis voláteis e a acidez volátil aplica-se nos vinhos a técnica de nanofiltração à qual é acoplada permuta de resinas fenólicas e aniónicas.

A eliminação do 4-etilfenol e 4-etilguaiacol foi conseguida pelo processo de Nanofiltração acoplado a resinas fenólicas. No entanto, não se conseguiu a redução desejada relativamente à acidez volátil quando as membranas de nanofiltração foram utilizadas com resinas aniónicas.

O processo de osmose inversa acoplado a resinas aniónicas revelou-se eficaz na redução da acidez volátil.

Palavras-chave: vinhos, fenóis voláteis, acidez volátil, *Brettanomyces/Dekkera*, barricas de carvalho, ácido acético, nanofiltração, permuta de resinas aniónicas e fenólicas.

Abstract

In the wine industry there are a number of parameters should be monitored and controlled in order to guarantee the quality of the wines. Some of the current concerns is the presence of volatile phenols (4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol) originating aromas of "leather" or "horse sweat", as well as the existence of high volatile acidity.

In the case of volatile phenols, the presence of these is associated with the activity of the yeast *Brettanomyces/Dekkera*, since the wines where they appear remain for a longer period of time without suffering clarification or filtration treatments, thus maintaining high concentration of flavors, pigments and colloids. These wines with an elevated structure and concentrations, combined with high pH values and low values of molecular SO₂ are conducive to microbial growth. In addition, the stage in wooden barrels, which cleaning is very difficult and high oxygen supply, also facilitate microbial growth.

Regarding the volatile acidity (due to acetic acid) when it reaches certain limits, it gives the wine an acrid or sour flavor and an undesirable aroma of vinegar, which make the wine is unfit for consumption. The acetic acid can be formed even before the alcoholic fermentation in grapes infected with *Botrytis cinerea*, or yeast contamination during fermentation by acetic bacteria and also during the stage or wine.

In order to reduce the volatile phenols and volatile acidity in wine the technique of nanofiltration, coupled with exchange of anionic and phenolic resins is applied.

The elimination of the 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol was accomplished by nanofiltration process coupled with phenolic resins. However, could not be reduced to the desired relatively volatile acidity when nanofiltration membranes were used with anionic resins.

The process of reverse osmosis coupled to anionic resins has proved effective in the reduction of volatile acidity.

Keywords: wine, volatile phenols, volatile acidity, *Brettanomyces / Dekkera*, oak barrels, acetic acid, nanofiltration, anionic exchange resins and phenolic.

Índice

Dedicatória e Agradecimentos.....	V
Resumo	VII
Abstract.....	VIII
1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e objetivos do presente trabalho.....	1
1.2 Presença de fenóis voláteis nos vinhos	3
1.2.1 Principais compostos e impacto sensorial	3
1.2.2 A origem dos fenóis voláteis.....	3
1.3 Caracterização de <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	7
1.3.1 Espécies, ecologia e condições de crescimento.....	7
1.3.2 Deteção de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> nos vinhos	8
1.4 Controlo das leveduras <i>Brettanomyces/Dekkera</i> nos vinhos	10
1.5 Acidez volátil nos vinhos.....	16
1.6 Nanofiltração.....	19
1.6.1 Tipos de membranas	22
1.6.2 Geometria dos módulos	22
1.6.3 Aplicações em enologia	25
1.7 Permuta Iónica	26
1.7.1 Funcionamento da permuta iónica.....	26
1.7.2 Aplicações na produção de vinho.	27
1.7.3 Implementação prática das resinas de troca iónica.....	28
2. Materiais e Métodos	29
2.1 Escolha do Vinho	29
2.2 Escolha das Membranas de Nanofiltração	29
2.3 Ensaio de Resinas	31
2.3.1 Condições do ensaio laboratorial 1- membranas 4040-XN45-TSF	32
2.3.2 Condições do ensaio laboratorial 2- membranas “O”	33
2.4 Ensaio Industrial – Fundamento teórico.....	34
2.5 Determinações analíticas – Análises Físico-químicas.....	35
2.5.1 Teor Alcoólico	35
2.5.2 Acidez Volátil	35
2.5.3 Acidez Total	36

2.5.4	pH	37
2.5.5	SO ₂ livre	37
2.5.6	So ₂ Total	37
2.5.7	Densidade Corrigida	38
2.5.8	Extrato Seco	38
2.5.9	Intensidade corante (IC)	38
2.5.10	Índice de Polifenóis Totais (IPT's)	38
2.5.11	Antocianinas	39
2.5.12	Taninos	39
3.	Resultados e Discussão	40
4.	Conclusões	45
5.	Bibliografia.....	47
6.	Anexo 1	57
7.	Anexo 2	61
8.	Anexo 3	63
9.	Anexo 4	64

Índice de Figuras

Figura 1.1: Reação de descarboxilação dos ácidos fenólicos do mosto pela <i>S. cerevisiae</i> durante a fermentação alcoólica (Ribéreau-Gayon et al., 2006).	4
Figura 1.2: Formação dos etilfenóis a partir dos seus percussores hidroxicinâmicos (Suárez <i>et al.</i> , 2007).....	5
Figura 1.3: Esquema simplificado da obtenção do permeado e do retentado.	20
Figura 1.4: Classificação dos processos de filtração (Osmonics, Inc. 1996).	21
Figura 1.5: Esquema de uma membrana com módulos tubulares (Koch membranes). .	23
Figura 1.6: Esquema de uma membrana com módulos em espiral (Koch membranes).	24
Figura 1.7: Esquema de uma membrana com módulos de fibra oca (Koch membranes).	24
Figura 1.8: Composição da resina permutadora de iões. Vários grupos funcionais introduzidos num material polimerizado (MP, quatro unidades de estireno e uma unidade de vinil benzeno) para facilitar diferentes reações (Weinand e Dedardel, 1994).	26
Figura 2.9: Colunas de ensaio da resina fenólica (XAD4, à esquerda) e aniónica (IRA92 à direita).....	32
Figura 2.10: Colunas do ensaio da resina Amberlite™ IRA92.....	33
Figura 2.11: Esquema Geral do Ensaio Industrial.....	34
Figura 2.12: Ebuliómetro utilizado para determinação do teor alcoólico.	35
Figura 2.13: Cazenave-Ferré utilizado para determinação da acidez volátil.....	36
Figura 2.14: Determinação da acidez total por titulação com NaOH 0.1M.	36
Figura 2.15: Doseamento do SO ₂ livre pelo Iodomatic.	37
Figura 2.16: Espectrofotómetro utilizado (Labda 25, UV/VIS Spetrometer; Perkin Elmer).	39
Figura 3.17: Capacidade de retenção da resina fenólica (XAD4) ao longo das 6 horas de trabalho.	41
Figura 3.18: Capacidade de retenção da resina aniónica (IRA92) ao longo das 6 horas de trabalho.	44

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Rejeição de íões por membranas de NF e RO (adaptado de Jane Kucera, 2010).....	19
Tabela 1.2: Peso molecular de alguns constituintes do vinho, adaptado de Memstar, Wine membrane Technology.....	21
Tabela 2.3: Análises físico-químicas realizada ao Vinho tinto inicial.	29
Tabela 2.4: Resumo das características da membrana 4040-XN45-TSF.	30
Tabela 2.5: Características Físico-químicas das resinas.....	31
Tabela 3.6: Resultados dos Fenóis Voláteis presentes no vinho a análise obtidos através da Cromatografia Gasosa.....	40
Tabela 3.7: Resultados das análises sumárias relativamente à acidez volátil nas amostras com a utilização da membrana de nanofiltração.	42
Tabela 3.8: Resultados das análises sumárias relativamente á acidez volátil nas amostras com a utilização da membrana de osmose inversa.	43
Tabela 3.9: Seleção da membrana a utilizar para a redução da acidez volátil através da observação do comportamento da membrana.	43

Listagem de abreviaturas, siglas e símbolos

Atm: atmosfera, unidade de pressão

Bv: bed volume

CD: cinamato descarboxilase

Da: daltons, unidade de medida de massa atômica

DMDC: Dimetil dicarbonato

Estireno-DVB gel/copolymer: Styrene-divenylbenzene gel/copolymer

GC: cromatografia gasosa

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

HPU: High-power ultrasonic

KI₃: Iodeto de Potássio

LEC: Low Electric Current

MgSO₄: sulfato de magnésio

Min: minuto, unidade de medida básica do Sistema Internacional de Unidades para intervalos de Tempo.

MPa: milipascal, Pascal (PA) unidade padrão de pressão e tensão no Sistema Internacional

MWCO: molecular weight cut-off

NaCl: cloreto de sódio

NF: nanofiltração

NTU: Nephelometric Turbidity Units

PEF: Pulsed Electric Field

RO: osmose inversa

SPME: microextração em fase sólida

4-EP: 4-etilfenol

4-EG: 4-etilgualicol

°C: Grau celsius

µg: micrograma, submúltiplo da unidade de medida de massa grama.

1. Introdução

1.1 Enquadramento e objetivos do presente trabalho

Existe uma preocupação elevada, cada vez mais, por parte do consumidor relativamente à qualidade dos produtos que consome e neste caso o vinho não é exceção. Tal facto obriga a que os produtores sejam cada vez mais exigentes com a qualidade do produto desde as matérias-primas até à sua produção final, pois a qualidade do produto é sem dúvida um fator fundamental na sua comercialização.

Na indústria vinícola subsistem uma série de parâmetros que devem ser monitorizados ou controlados, de forma a garantir a qualidade dos vinhos. Uma das preocupações atuais é a presença de **fenóis voláteis** (4-etilfenol e 4-etilgualicol) que originam aromas a “couro” ou “suor de cavalo”, bem como uma **acidez volátil** elevada.

No caso dos fenóis voláteis, a presença destes está associada à atividade das leveduras *Brettanomyces/Dekkera*, que afetam mais os vinhos considerados de maior qualidade. Resumindo-se ao facto de estes permanecerem durante um longo de tempo sem sofrerem clarificações, filtrações ou tratamentos mantendo assim elevadas concentrações de aromas, pigmentos e coloides. Estes vinhos com uma elevada estrutura e concentração, aliadas a valores de pH elevados e baixos valores de SO₂ molecular são propícios ao desenvolvimento microbiano. Além disso, o seu estágio em barricas de madeira, de higienização difícil e elevado aporte de oxigénio, facilita também o crescimento microbiano.

Relativamente à acidez volátil (proveniente do **ácido acético**) quando atinge certos limites, confere ao vinho um sabor acre ou azedo e um aroma indesejável a vinagre, o que faz com que o vinho seja impróprio para consumo. O ácido acético pode ser formado ainda antes da **fermentação alcoólica** nas uvas infetadas com *Botrytis cinerea*, ou por leveduras de contaminação durante a fermentação alcoólica e ainda pelas bactérias acéticas durante o estágio do vinho.

A prevenção é a forma de combater estes problemas, quer seja efetuando testes periódicos nos vinhos, quer controlando as uvas à recepção e, no futuro, otimizando técnicas de higienização. Contudo, nem sempre as técnicas de prevenção da contaminação, do controlo do crescimento ou da eliminação de microrganismos nos vinhos se mostram eficientes.

Deste modo, é importante estudar métodos/processos que reduzam estes problemas indesejáveis de maneira a recuperar a qualidade de excelência do produto necessária à sua comercialização.

1.2 Presença de fenóis voláteis nos vinhos

1.2.1 Principais compostos e impacto sensorial

Os fenóis voláteis, vinil-fenóis e etil-fenóis, podem ser produzidos através da atividade microbiológica, dando origem a aromas estranhos, facilmente detetados nos vinhos. O 4-etilfenol (4-EP), 4-vinilguaiacol, 4-vinifenol e 4-etilguaiacol (4-EG) são os que possuem maior destaque. Elevadas concentrações destes compostos, nomeadamente o 4-etilfenol, são associadas a aromas desagradáveis descritos como fenólicos, medicinais ou animais (“couro”, “suor de cavalo”, “animal”, “cavalariça”, etc) (Chatonnet *et al.*, 1990). Já o 4-vinilfenol é descrito como aroma a “farmacêutico” e “guache” (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Por fim temos o 4-vinilguaiacol (“cravinho”) e o 4-etilguaiacol (“fumado”), que apresentam aromas menos desagradáveis e por isso estão sempre associados ao 4-vinifenol e 4-etilfenol.

Os vinhos brancos têm concentrações variáveis de vinilfenóis, estando os etilfenóis geralmente ausentes. O limite de percepção olfativa (concentração a partir da qual o aroma global do vinho é prejudicado) nestes vinhos, considerando a proporção 1/1 de 4-vinilfenol/4-vinilguaiacol, é de 725 µg/L (Chatonnet *et al.*, 1990). No caso dos vinhos tintos, estes contêm concentrações baixas de vinilfenóis e concentrações variáveis de etilfenóis, sendo o seu limite de percepção olfativa de 425 µg/L numa proporção de 10/1 de 4-etilfenol/4-etilguaiacol (Chatonnet *et al.*, 1992, Chatonnet *et al.*, 1993).

É de realçar que o tipo de casta também afeta os limites da percepção olfativa, bem como a qualidade aromática de cada vinho.

1.2.2 A origem dos fenóis voláteis

Os vinilfenóis, em vinhos brancos, resultam da descarboxilação enzimática de dois ácidos cinâmicos do mosto (ácido p-cumárico e ácido ferrúlico), originando o 4-vinifenol e o 4-etilgualicol. Esta descarboxilação ocorre por meio da enzima cinamato descarboxilase (CD) da *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica (Fig.1.1). A concentração de vinilfenóis nos vinhos brancos depende do conteúdo de ácidos fenólicos e da atividade da CD (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A baixa concentração de vinilfenóis nos vinhos tintos deve-se essencialmente à inibição da enzima cinamato descarboxilase por certos compostos fenólicos das uvas. (Chatonnet *et al.*, 1989, 1993).

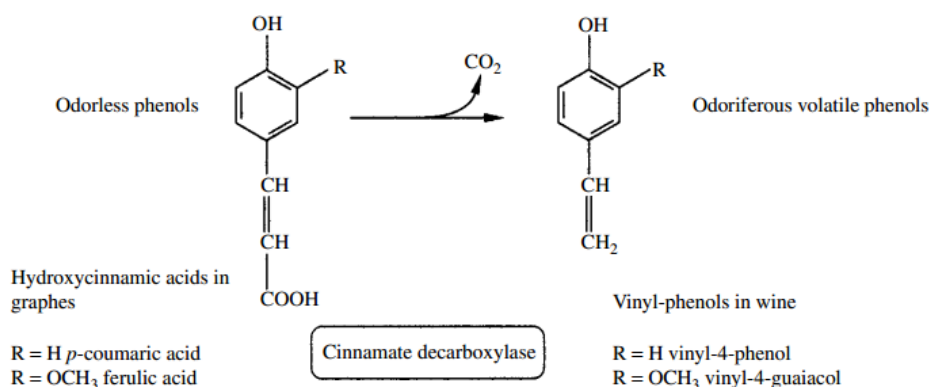


Figura 1.1: Reação de descarboxilação dos ácidos fenólicos do mosto pela *S. cerevisiae* durante a fermentação alcoólica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Relativamente aos etilfenóis, raramente se formam durante a fermentação alcoólica. A formação destes compostos é frequente durante o estágio dos vinhos (vinhos tintos), principalmente quando armazenados em barricas e durante meses mais quentes (o aumento da temperatura favorece o desenvolvimento microbiano). O aumento de etilfenóis pode ainda manifestar-se em garrafa, podendo haver dentro do mesmo lote garrafas com ou sem estes compostos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Frequentemente tem ocorrido a formação deste composto entre a fermentação alcoólica e a fermentação maloláctica, período em que a falta de SO₂ (dióxido de enxofre ou anidrido sulfuroso) e as técnicas de microoxigenação aceleram a sua formação. A fermentação maloláctica é outro período vulnerável para a contaminação, pois está associada a baixos níveis de anidrido sulfuroso livre na presença de açúcar residual (Oelofse *et al.*, 2008). Os etilfenóis são mais comuns em vinhos tintos do que em brancos, em grande parte devido à eficácia do SO₂ a pH baixo (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006). Além disso, os vinhos tintos possuem uma acidez baixa, elevado teor de polifenóis e estágio em barricas, o que favorece a contaminação por *Brettanomyces*. Os vinhos brancos não parecem ter o carácter aromático *Brettanomyces* devido à ausência de compostos precursores (Chatonnet *et al.*, 1992).

Tanto a *Brettanomyces*, como a forma esporulante *Dekkera* são capazes de produzir o 4-EP e o 4-EG a partir dos ácidos hidroxicinâmicos *p*-cumárico e ferrúlico das uvas, devido à ação de duas enzimas: hidroxicinamato descarboxilase e vinilfenol reductase. A primeira descarboxila os ácidos hifroxicinâmicos no derivado vinil

correspondente (4-vinilfenol e 4-vinilguaiaicol), na segunda reação a vinilfenol reductase reduz o grupo vinil no correspondente composto etil, dando origem ao 4-EP e 4-EG (Heresztyn, 1986a; Edin *et al.*, 1998; Dias *et al.*, 2003a; Chatonnet *et al.*, 1992a e b, 1993c, 1995) (Fig.1.2).

A enzima responsável pela primeira reação, a hidroxicinamato descarboxilase, encontra-se presente num grande número de bactérias, fungos e leveduras, enquanto que o passo de redução, está apenas presente nas espécies *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anómala*, *Pichia guillermondii*, *Candida versatilis*, *Candida halófila* e *Candida mannifaciens* (Chatonnet *et al.*, 1995; Chatonnet *et al.*, 1997; Dias *et al.*, 2003a; Edin *et al.*, 1995; Suezawa,1995).

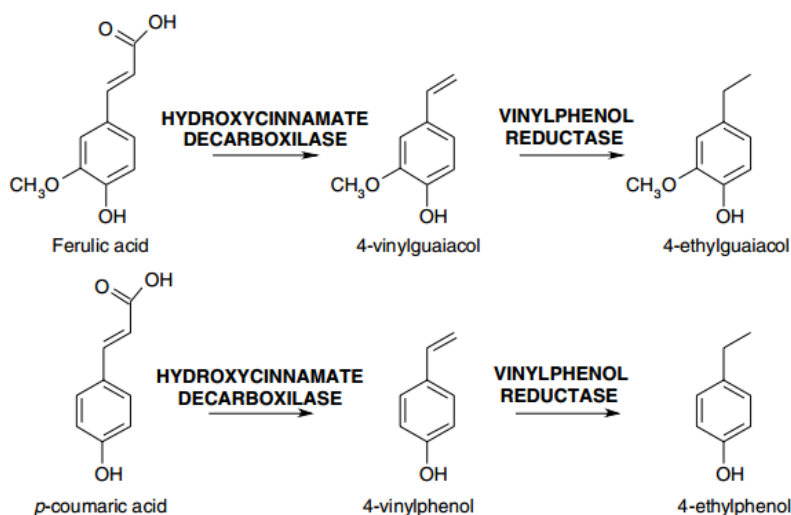


Figura 1.2: Formação dos etilfenóis a partir dos seus precursores hidroxicinâmicos (Suárez *et al.*, 2007).

Inicialmente considerava-se que a presença de etilfenóis nos vinhos devia-se às bactérias lácticas. De facto, estas bactérias conseguem produzir quantidades elevadas de etilfenóis, no entanto nas condições enológicas produzem apenas pequenas quantidades, quando comparadas com as *Brettanomyces* (ou *Dekkera*). Outras leveduras presentes nos vinhos, como a *Pichia spp*, *Torulaspóra spp*, *Zygosaccharomyces spp* e *Saccharomyces cerevisiae* podem produzir 4-vinilfenol, mas não reduzi-lo a 4-etilfenol devido à ausência da vinilfenol fenol reductase (Dias *et al.*, 2003).

A relação entre elevadas concentrações de 4-EP e a atividade de *Brettanomyces/Dekkera* foi muito estudada desde 1990 (Chatonnet *et al.*, 1995, 1997; Cullere *et al.*, 2004; Kelly, 2003; Suárez-Lepe, 2001; Fugelsang e Zoecklein, 2003; Parish *et al.*, 2003), particularmente em vinhos tintos por serem mais ricos em

precursores cinâmicos e pelo facto da atividade da hidroxicinamato descarboxilase da *Brettanomyces/Dekkera* não ser afetada pelos compostos fenólicos (Chatonnet *et al.*, 1992).

As leveduras *Brettanomyces/Dekkera* são ainda produtoras de ácido acético (Freer *et al.*, 2000, 2003; Suárez-Lepe e Inigo, 2004), e de tetrahidropirinas causadoras do aroma a “rato” (Heresztyn, 1986). Em condições favoráveis, podem ainda hidrolisar antocianinas, libertando a glicose e desestabilizando a aglicona (Mansfield *et al.*, 2002). Esta pode ser a razão pela qual o vinho contaminado por *Brettanomyces/ Dekkera* tem uma cor indesejada.

1.3 Caracterização de *Brettanomyces/Dekkera*

1.3.1 Espécies, ecologia e condições de crescimento

A levedura *Brettanomyces* é descrita como sendo a forma assexuada e não esporulante da *Dekkera* (forma sexuada esporulante), no entanto as duas denominações são usadas mutuamente. Atualmente, existem 5 espécies pertencentes ao género *Brettanomyces/Dekkera*: *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* e *B. nanus* (Kurtzman e Fell, 2000), sendo que apenas as primeiras duas têm sido associadas aos vinhos. Ambos os géneros (*Brettanomyces/Dekkera*) podem crescer durante o estágio dos vinhos tintos ou após o seu engarrafamento. Estas leveduras por norma estão ausentes durante a fermentação alcoólica. *D. bruxellensis* demonstra um crescimento relativamente baixo quando comparada com outras leveduras com *S. cerevisiae* ou *Z. bailii* (Rodrigues *et al.*, 2001a). Esta é uma característica bem conhecida dos géneros *Brettanomyces/Dekkera* (Deak e Beuchat, 1996), que explica o longo período de incubação necessário para o seu isolamento em meio de cultura (Rodrigues *et al.*, 2001b). Contudo, a *D. bruxellensis* sobrevive durante a fermentação alcoólica, mesmo que em pequenas quantidades, podendo atuar no final desta (Dias *et al.*, 2003b). Este facto pode explicar a presença ocasional de etilfenóis nos vinhos após a fermentação alcoólica (Rodrigues *et al.*, 2001b) e realça a importância do correto acompanhamento das vinhas e da sua vindima. Alguns estudos já demonstraram a presença destas leveduras nas uvas (Pretorius, 2000), assim como em armazéns de vinho (Peynaud e Domercq, 1956) e também em depósitos, bombas e outros equipamentos difíceis de esterilizar (Fugelsang, 1998).

Durante a fermentação alcoólica são criadas condições de anaerobiose que não são favoráveis ao crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* – o chamado “Custer Effect” (Efeito Pasteur negativo). Scheffers e Wikén (1969) introduziram este conceito e foram os primeiros a usá-lo como critério taxonómico. Apesar da passagem da aerobiose para anaerobiose atrasar o crescimento de *Brettanomyces*, esta é uma situação reversível, quer pela adição de oxigénio ou adição de aceitadores de electrões, como é o caso dos compostos carbonilo (Wikén, 1967). O efeito positivo da adição de oxigénio explica o facto de a microoxigenação favorecer o crescimento destas leveduras, quando usada durante a fermentação ou estágio dos vinhos (Louvaud-Funel, 1999), assim como o favorecimento de desenvolvimento durante os estágios em barricas (condições

naturalmente oxidativas) ou com as trasfegas (Malfeito-Ferreira *et al.*, 2001). Em condições de anaerobiose estrita, nos vinhos secos, é ainda possível que estas leveduras se desenvolvam e produzam quantidades importantes de etilfenóis, degradando apenas pequenas quantidades de açúcares residuais (glucose, frutose, arabinose e trealose). Para que a quantidade de etilfenóis ultrapasse o seu limite de deteção olfativo é apenas necessário o consumo de 300 mg/L de açúcares residuais por parte destas leveduras (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

O armazenamento dos vinhos a baixas temperaturas atrasa ou inibe o crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* (maior suscetividade ao desenvolvimento nos meses mais quentes) (Chatonnet *et al.*, 1993b).

A formação de etilfenóis depende da presença de precursores e é proporcional ao tamanho da população *Brettanomyces/Dekkera*. As diferentes espécies existentes também têm diferentes capacidades de produzir etilfenóis. Esta capacidade é influenciada pela concentração de etanol (maior a 12% v/v do que a 14% v/v) e pela temperatura (maior produção a 18°C do que a 13°C). À presença de açúcares residuais e ao pH do vinho é atribuída uma importância menor (Gerbeaux *et al.*, 2002).

As espécies mais comuns nos vinhos apresentam uma boa eficiência de conversão do ácido p-cumárico em 4-EP (Heresztyn, 1986a; Fugelsang e Zoecklein, 2003).

1.3.2 Deteção de *Brettanomyces/Dekkera* nos vinhos

Perdas económicas significativas podem resultar da contaminação de vinhos por *Brettanomyces/Dekkera*, pelo que é importante a sua vigilância e controlo. Métodos moleculares já foram estudados e descritos para a deteção e identificação de *Brettanomyces/Dekkera* nos vinhos, tais como: o desenvolvimento do método de PCR utilizando um fragmento de DNA genómico isolado de uma estirpe de *Dekkera* (Ibeas *et al.*, 1996), o desenvolvimento de um método de fluorescência de hibridação *in situ*, tendo como alvo uma sequência específica do RNA ribossómico de *D. bruxellensis* (hibridação RNA-FISH) (Stender *et al.*, 2001, 2002), e o desenvolvimento de um método de identificação de *Brettanomyces/Dekkera* baseado no polimorfismo da região espaçadora transcrita do RNA ribossómico (Egli e Henick-kling, 2001; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Procedimentos baseados na análise da composição química, como por exemplo de ácidos gordos, também têm sido aplicados na diferenciação destas

leveduras (Rozès *et al.*, 1992; Sancho *et al.*, 2000; Malfeito-Ferreira *et al.*, 1997). A maioria das empresas não usa estes métodos devido ao elevado nível de sofisticação laboratorial e a necessidade de pessoal especializado.

Rodrigues *et al.* (2001) desenvolveram um meio sólido seletivo e diferencial, capaz de recuperar *Brettanomyces/Dekkera* do vinho e ambientes relacionados, dando assim um passo importante no desenvolvimento de métodos mais simples para a deteção destes organismos.

A deteção de fenóis voláteis pode ser feita por cromatografia gasosa (GC) (Bertrand, 1981). Outros autores estudaram ainda métodos como: uso de padrões marcados com deutério, 4-etilfenol-d₃, (Rayne e Eggers, 2007); microextração líquido-líquido dispersiva seguida de deteção por cromatografia gasosa- espectrometria de massa (Fariña *et al.*, 2007); microextração em fase sólida (SPME) (Pizarro *et al.*, 2007) e deteção por cromatografia gasosa- espectrometria de massa associada à olfactometria (GC/MS/olfactometry) (Cullere *et al.*, 2004), onde as substâncias voláteis são separadas através de uma coluna capilar, identificadas pela espectrometria de massa e a intensidade e qualidade dos compostos separados é avaliada por um provador.

1.4 Controlo das leveduras *Brettanomyces/Dekkera* nos vinhos

O enólogo tem ao seu dispor uma série de medidas a fim de precaver a atividade microbiológica e contaminação dos vinhos. Estas medidas envolvem o uso de agentes inibitórios ou letais, como tratamentos químicos ou tratamentos térmicos. Outras técnicas como clarificação ou filtração servem para diminuir ou eliminar a presença de possíveis contaminações por *Brettanomyces/Dekkera*. Todas estas medidas devem ser acompanhadas por rigorosos processos de limpeza, a fim de prevenir a colonização das superfícies da adega bem como dos seus equipamentos. Além disso há que ter em conta que o próprio vinho não apresenta um ambiente favorável ao crescimento microbiológico (Malfeito-Ferreira, 2010). As características intrínsecas de cada vinho determinam a eficiência das medidas de controlo aplicadas. Por exemplo, um vinho com baixo teor em nutrientes torna-se menos suscetível de ser alvo de contaminações assim como o elevado teor em etanol aumenta a sua robustez. Com efeito oposto, pode ser adicionado oxigénio para promover o envelhecimento de vinhos, o que é um procedimento que pode estimular o crescimento de leveduras. Além disso, um grande obstáculo enfrentado pela indústria de vinhos é a necessidade de diminuir o uso de dióxido de enxofre, devido à sua associação a alergias em humanos. Este composto está sujeito a um rigoroso controlo do limite legal (Malfeito-Ferreira, 2010).

A *Brettanomyces* pode ser encontrada quer em uvas, quer nos equipamentos da adega ou ainda durante o seu estágio em barricas de madeira, pelo que o primeiro passo para a sua prevenção consiste na aplicação de medidas de higienização constante e eficiente de toda a adega durante todo o ano (Laureano *et al.*, 2004). Durante o período da vindima é fundamental higienizar os equipamentos a uso (tegões, esmagadores/desengaçadores, bombas, mangueiras, etc), evitando a propagação dos microrganismos que vêm da vinha (Boulton *et al.*, 1996).

É comum a utilização de **dióxido de enxofre** (SO₂) como agente antimicrobiano para inibição do crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* (Chatonnet *et al.*, 2003b). Estes autores demonstraram que a quantidade de etilfenóis produzida, num mesmo vinho, decresce segundo o aumento da concentração de SO₂. É recomendada a utilização de concentrações entre 0,5 e 0,8 mg/L de SO₂ molecular (Fugensang e Edwards, 2007; Henick-Kling *et al.*, 2000), o qual depende do pH do vinho (ex.: 30 mg/L de SO₂ livre origina 0,4 mg/L SO₂ molecular a pH 3.7 e 0,8 mg/L a pH 3.4) (Suaréz *et al.*, 2007). Ao longo do tempo, estes valores são difíceis de manter em barricas devido ao seu ambiente oxidativo. Por exemplo, um vinho tinto com pH 3.65, e

com doses iniciais de SO₂ livre de 15, 25, 30 e 35 mg/L, ao fim de quatro meses de estágio em barrica, viu a concentração de SO₂ livre a diminuir para 6, 11, 10 e 15 mg/L, respetivamente (Chatonnet *et al.*, 1993). Segundo du Toit (2005), a deterioração pode ser minimizada através do uso eficaz de SO₂ e reduzindo a quantidade de oxigénio disponível durante todo o processo de produção, especialmente nas trasfegas (passagem do vinho de um barril para outro durante o estágio do mesmo).

O **Dimetil dicarbonato** (DMDC), comercialmente conhecido por Velcorin (Scott Laboratories, Petaluma, Califórnia), é um conservante recentemente aprovado na União Europeia (UE). Apenas é permitido pela UE a aplicação de 200 mg/L de DMDC no engarrafamento de vinhos com mais de 5 g/l de açúcar, no caso dos EUA pode ainda ser utilizado durante o armazenamento de vinho em quantidades regulares até ao nível máximo de 200mg/L (Fulgensang e Edwards, 2007). Delfini *et al.* (2002) verificaram anteriormente que a dose de 400 mg/L não inibia completamente o crescimento neste caso de *B. anomalus*. O DMDC tem sido ainda estudado em combinação com o SO₂, de forma a entender a atividade sinérgica entre eles e a baixar a quantidade de SO₂ necessária (Divol *et al.*, 2005). Foi demonstrado que com 50 mg/L de DMDC e 25 mg/L de SO₂ livre consegue-se o controlo microbiológico.

Foi igualmente mostrado que o **quitosano** (polissacarídeo derivado da quitina) possui um efeito seletivo sobre *Brettanomyces*, provocando um atraso na sua fase latente em culturas mistas com *Saccharomyces cerevisiae* (Gómez-Rivas *et al.*, 2004). Segundo Kiskó *et al.* (2005) a *B. bruxellensis* não consegue crescer na presença de 3-6 g/L deste composto, enquanto o desenvolvimento de *S. cerevisiae* não é afetado. A aplicação de 0,05-0,1% de quitosano é conhecida por atrasar a deterioração de alimentos por leveduras a 25 °C.

O **ácido sórbico** é utilizado como antifúngico e a sua ação incide sobre as leveduras fermentativas clássicas, sendo pouco eficaz contra leveduras de deterioração como *Zigosaccharomyces* e *Brettanomyces/Dekkera* (Fulgelsang, 1996). O ácido benzoico e o ácido fumárico também têm atividade antifúngica, podendo ser usados contra *Brettanomyces/Dekkera*. Contudo, a sua ação não é seletiva e o seu uso não está autorizado em enologia. Antioxidantes como o ácido ascórbico podem ser utilizados para reduzir a presença de oxigénio durante a maturação (estágio dos vinhos), prevenindo assim a formação etilfenóis (Suaréz *et al.*, 2007).

Gerbeaux *et al.* (2000) referem ainda que é possível inibir a atividade de *Brettanomyces/Dekkera* através do estágio dos vinhos a baixas temperaturas, baixo

pH, baixas concentrações de oxigénio e teores alcoólicos elevados. No entanto, estágios de vinhos mais intensos dão origem a vinhos com mais corpo, estrutura, cor e aroma.

Filtração, clarificação com proteínas e aplicação de **pressões elevadas** são ainda outras técnicas eficientes na redução ou eliminação de *Brettanomyces/Dekkera*. Calderón *et al.* (2004) afirma que para a filtração ser eficaz deve-se utilizar membranas com um tamanho de poro inferior a 0.45 µm, o que pode provocar a deterioração da estrutura coloidal do vinho e reduzir a intensidade da sua cor. Além disso, as formas latentes, de células alongadas *Brettanomyces* podem ser aptas a passar através de um filtro de 0.45 µm. A aplicação de altas pressões para a conservação microbiológica tem sido eficaz em derivados lácticos, sumos de fruta, etc. Relativamente à enologia a sua utilização tem sido pouco estudada. No entanto, Puig *et al.* (2003) demonstraram que a aplicação de uma pressão de cerca de 400-500 MPa, durante 5-15min, a temperaturas entre 5-20°C, pode reduzir até mais de 99% das populações de algumas leveduras (incluindo *B. bruxellensis*) e de bactérias lácticas e acéticas em vinhos.

Murat e Dumeau (2003) mostraram que a clarificação dos vinhos com proteínas (caseína, clara de ovo, etc.) pode reduzir 40 a 2000 vezes as populações de *Brettanomyces* por floculação. Quanto maior a quantidade de agentes clarificadores utilizados, maior é a redução da população inicial de *Brettanomyces/Dekkera*, contudo uns são mais eficazes que outros.

Segundo Malfeito-Ferreira (2005) foram encontradas células de *Brettanomyces/Dekkera* no interior das aduelas das barricas até uma profundidade de 8 mm, o que dificulta a eliminação destes organismos. Alguns procedimentos de **higienização** foram testados por Malfeito-Ferreira (2005) com o objetivo de esterilizar barricas contaminadas com estas leveduras, nomeadamente:

- a) Passagem por água fria, seguida de três passagens com água quente (70°C);
- b) O mesmo que a), sendo que posteriormente se encheu a barrica com uma solução aquosa de SO₂ (200 mg/L, pH=3) e armazenou-se durante um mês;
- c) Passagem com água fria, seguida de enchimento da barrica com água quente 90°C durante 10 min;
- d) Passagem com água fria, seguida por uma passagem com água quente (70°C) e vapor (10min).

Segundo o autor, o procedimento mais eficiente foi o d). Este ainda recomenda que todas as barricas contaminadas sejam isoladas das outras durante a trasfega do vinho e desinfeção.

A **esterilização com ozono** pode ser uma alternativa para abordagens tradicionais de controlo microbiano, para todas as formas microbiológicas: fungos, bactérias, vírus e esporos (Kladre *et al.*, 2001). Várias aplicações para o ozono foram testadas em diferentes fases de vinificação, nomeadamente, na redução da deterioração na microflora nas uvas, barris e depósitos e ainda como alternativa a agentes de vapor ou químicos durante o processo de higienização no engarrafamento, garrafas, barris, etc (Guillen *et al.*, 2010). Guzzon *et al.* (2013) realizaram um estudo com o objetivo de definir a aplicação e possíveis riscos associados ao uso do ozono como agente de higienização em adegas. Considerando que o risco de maior contaminação microbiana ocorre durante o envelhecimento do vinho em barris, o estudo centrou-se assim sobre a eficácia do ozono no combate os microrganismos indesejáveis que deterioram o vinho e que se adaptaram bem ao ambiente do barril e sobre o impacto do ozono sobre fenóis simples.

Embora alguns autores considerem que as barricas usadas favorecem a contaminação de *Brettanomyces/Dekkera*- devido à difícil eliminação das leveduras dos poros da madeira (Chatonnet *et al.*, 1999) - outros defendem que as barricas novas favorecem a manutenção das populações numerosas de *Brettanomyces/Dekkera* (Louvaud-Funel e Rebauf, 2005) – devido a uma maior contribuição de oxigénio e de açúcares (glucose resultante da degradação da celobiose formada durante a tosta de madeira).

Couto *et al.* (2005) estudaram a inativação de populações de *Brettanomyces/Dekkera* no vinho através de **tratamentos térmicos**. Verificaram que ocorre uma significativa inativação térmica das leveduras estudadas (*D. bruxellensis* PYCC 4801; *D. anomala* PYCC 5153 e *Dekkera/Brettanomyces* 093) a partir dos 35 °C. Apuraram que estas leveduras são muito mais sensíveis à inativação térmica em vinhos do que em solução tampão. Esta sensibilidade é atribuída ao etanol, podendo ainda ser potenciada pelo conteúdo fenólico dos vinhos, em particular o ácido ferrúlico. No entanto, os produtores de vinho estão geralmente relutantes em usar tratamentos térmicos, devido a efeitos prejudiciais no vinho de qualidade organoléptica e longevidade.

Ugart *et al.* (2005) usaram a osmose reversa e a adsorção (através da utilização de uma resina hidrofóbica) para tentar reduzir a quantidade de etilfenóis em vinhos. Os vinhos submetidos a este tratamento sofreram uma significativa redução na concentração de 4-etil-fenol e 4-etilguaicol (até aos 77%). Não se observou perda de

cor, taninos, corpo (glicerol e diois) ou etanol, mas foi observada uma redução na concentração de outros compostos aromáticos (ácidos, esteres, álcoois).

Um novo sistema utilizando um campo de pulsão elétrica (Pulsed Electric Field-**PEF**) desenvolvido por Puertolas *et al.* (2009) permitiu a redução de 99,9% da deterioração do mosto e do vinho especialmente no controlo da contaminação microbiológica por *Dekkera* e *Lactobacillus*. A PEF é uma tecnologia emergente, não térmica para a pasteurização ou esterilização de líquidos homogéneos de modo a reduzir a contaminação microbiana (Santos *et al.*, 2012). Segundo Puertolas *et al.* (2009) a PEF pode ser aplicada em ambos os mostos de uvas e vinhos acabados, contudo revela que o tratamento é geralmente mais eficaz quando usado depois da fermentação. A utilização deste método não revela alterações de cor e aromas.

Já a utilização na vinificação de baixa corrente elétrica (Low Electric Current-**LEC**) pode impedir o crescimento de leveduras indesejáveis como *Brettanomyces/Dekkera*, mas provoca perda de organização celular traduzindo-se em mudanças evidentes de cor e aroma (Lustrato *et al.*, 2010). A corrente é geralmente aplicada no produto a menos de 200 mA durante um período de dias a vários meses.

A tecnologia de ultrassons de alta potencia (High-power ultrasonic- **HPU**) tem sido utilizada ao longo da última década para a pasteurização, esterilização e inativação de alimentos (O'Donnell *et al.*, 2010). Na indústria do vinho, esta técnica é utilizada para limpeza de tártaro dos barris e mais recentemente para a inativação de microrganismos (Schmid *et al.*, 2011). Schmid *et al.* (2011) demonstraram que um tratamento de 10 minutos em barris de carvalho eliminou efetivamente toda a população de *B. bruxellensis*.

Recentemente, a eficácia da tecnologia de **micro-ondas**, que é um tratamento curto (1 min repetido 3 vezes) com base na utilização de uma sequência de impulsos do gerador de alta frequência (3000 W), foi testado em barris de carvalho, a fim de remover os microrganismos em profundidade (8mm dentro das aduelas dos barris). O tratamento não afetou a qualidade química da madeira, apesar de ter um efeito nas populações microbianas em cerca de 35-67% da *B. bruxellensis* (González- Arenzana *et al.*, 2013).

A empresa Enartis propõe uma gama de produtos enológicos de mais alta qualidade e fiabilidade. Em 2008, entre outros agentes clarificantes já existentes, lançou o FENOL FREE, um coadjuvante à base de carvão para o tratamento de vinhos contaminados com *Brettanomyces*. Este coadjuvante não apresenta efeitos colaterais

negativos sobre a estrutura e, mesmo a baixa dose utilizada (5-20 g/hL), elimina os fenóis voláteis produzidos pela *Brettanomyces/Dekkera*, reestabelecendo uma adequada limpeza olfativa. Pode ser usado como tratamento corretivo ou preventivo no caso do pré-engarrafamento. Este clarificante corretivo não tem efeito ao nível da estabilização microbiológica do vinho, pelo que não atua eliminando as células de *Brettanomyces/Dekkera*, mas sim aos fenóis voláteis por elas produzidos.

1.5 Acidez volátil nos vinhos

A qualidade do vinho depende de muitos fatores, um dos quais a acidez volátil. A acidez volátil, expressa em g/L de ácido acético, pode conferir ao vinho um sabor ácido ou azedo ou um aroma indesejável a vinagre quando se encontra acima de certos limites, tornando o vinho impróprio para consumo, traduzindo-se assim em perdas económicas para o produtor (Bely *et al.* 2003). Segundo a legislação europeia (OIV, 2009) o limite máximo aceitável para a acidez volátil na maioria dos vinhos é de 1,2 g/L de ácido acético. O limiar do aroma para o ácido acético depende da variedade de vinhos. Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) afirma que é apenas necessário uma concentração de 0,90 g/L de ácido acético para produzir um sabor azedo perceptível no vinho, embora não cause um odor forte. Para a indústria enológica torna-se importante a remoção do ácido acético dos vinhos a fim de colmatar a qualidade desejada.

A formação do ácido acético ocorre em qualquer momento da produção do vinho. Pode ser produzido antes da fermentação alcoólica por deterioração microbiana das uvas infetadas com *Botrytis cinerea*, durante a fermentação alcoólica pelas leveduras de contaminação ou em ambiente hiperosmótico, durante a fermentação maloláctica pelas bactérias heterofermentativas ou após a fermentação como produto de bactérias de ácido acético (Boulton *et al.*, 1996). O teor elevado em ácido acético pode resultar da atividade metabólica das bactérias do ácido acético. Em alguns casos pode ocorrer produção de ácido acético mesmo após o engarrafamento do vinho. A produção de ácido acético pode resultar na formação de compostos voláteis desagradáveis, tal como o acetato de etilo que provoca um aroma indesejável (Moreno-Arribas e Polo, 2005). Quando há o rompimento da pele da baga da uva, causado pela infeção (*Botrytis cinerea*), as bactérias podem atingir o interior da baga. Geralmente as espécies *Gluconobacter* ocorrem em uvas, mas espécies de *Acetobacter* podem encontrar-se na superfície da uva, usando o etanol como fonte de carbono (Du Toit., 2002).

Leveduras do vinho também podem produzir ácido acético, para equilibrar o equilíbrio redox em resposta ao *stress* hiperosmótico causado por elevadas concentrações de açúcar, que se pode revelar grave no elevado Brix (> 35°Brix) no mosto de uvas e em vinhos feitos a partir de uvas infetadas com *Botrytis* (Erasmus *et al.*, 2004). Segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) a produção do ácido acético também é favorecida pela anaerobiose, valores de pH abaixo de 3.1 ou acima de 4.0 e pelo mosto de uvas excessivamente clarificado.

Na indústria vinícola têm sido propostos vários processos para reduzir os níveis de ácido acético. Segundo Vilela-Moura *et al.* (2011) existem três métodos:

- a) **Loteamento de vinhos** (mistura de um vinho com elevada acidez volátil e outro com baixa acidez volátil. Este método pode levar à redução da qualidade do vinho);
- b) **Osmose reversa (OR)** e **Nanofiltração (NF)** (processo que acarreta um maior custo económico);
- c) Remoção de ácido acético através de **refermentação** (utilizando estirpes de leveduras);

O loteamento de vinhos pressupõe a estabilização microbiológica do vinho anteriormente à sua mistura com vinhos de baixo teor de acidez volátil (baixo teor de ácido acético). O vinho resultante pode ter um valor comercialmente reduzido. O vinho azedo pode ainda ser vendido para fins de destilação para obtenção do etanol, sendo também uma medida associada a perdas económicas. A OR e a NF são processos alternativos de desacidificação dos vinhos azedos que requerem equipamentos sofisticados, por isso para quem os possui é uma mais-valia para a obtenção de um produto final de qualidade. Estas técnicas (OR e NF) produzem um permeado rico em ácido acético, o qual é seguidamente tratado por permuta iónica para remover o ácido (Boulton *et al.*, 1996). Vinovation, uma empresa californiana, propõe acoplamento OR e resinas de permuta aniónica, em que o permeado da OR (contendo principalmente água, etanol, e ácido acético) é acoplado com uma **resina de permuta** de iões para a remoção da acidez volátil. O permeado tratado é então combinado com o retido. A empresa VA Filtration propõe uma combinação de NF e a adsorção seletiva de ácido acético. Uma terceira abordagem consiste na combinação de duas fases de OR, onde o ácido do primeiro permeado é neutralizado passando à forma de sal e, em seguida, retido pela segunda fase de membrana OR (Massot *et al.*, 2008).

A refermentação consiste na mistura de vinho ácido com mosto fresco de uvas esmagadas e inoculação de leveduras em crescimento oxidativo que podem utilizar o ácido acético como fonte de carbono (Vilela-Moura *et al.*, 2008). Esta prática no entanto torna o vinho propenso à contaminação e pode ter um impacto negativo sobre o vinho. Assim, em vez de remover o ácido acético a partir do vinho, novas estratégias estão direcionadas na redução da formação de ácido acético durante a fermentação (Luo *et al.*, 2013). Uma destas estratégias é a utilização de misturas de *Saccharomyces* e estirpes

não *Saccharomyces* em fermentações. Estirpes de *Torulospira delbrueckii* e *Candida zemplinina* foram combinadas com *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo-se uma redução de 50-53% da acidez volátil (Bely *et al.*, 2008; Renaul *et al.*, 2009; Rantsiou *et al.*, 2012). Recentemente, Cordente *et al.* (2013) utilizaram uma abordagem de uma mutagénese clássica para isolar estirpes ceruleninas resistentes a partir de um fermento de vinho comercial diploide que produz menos ácido acético durante a fermentação do vinho.

Em 2008, Vilela-Moura *et al.* demonstraram a redução da acidez volátil de vinhos por **estirpes de leveduras selecionadas**, onde concluíram que a estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* S26 pode diminuir a acidez volátil dos vinhos ácidos que apresentam uma acidez volátil superior a 1,44 g/L de ácido acético, sem ter qualquer impacto negativo sobre o aroma do vinho.

A **imobilização de células** por retenção em esferas tem tido um impacto crescente desde a década de 1980, resultando num grande número de aplicações industriais, nomeadamente, na indústria vinícola. Em comparação com as suspensões de cultura de células, esta técnica oferece a vantagem de utilização de células e proteção de células imobilizadas a partir de substâncias inibidoras no meio fermentativo (Riley *et al.*, 1999). Vilela *et al.* (2013) mostraram que as células de levedura imobilizadas em esferas de alginato-quitosano podem ser utilizadas para corrigir a acidez volátil excessiva e, por conseguinte, melhorar a qualidade global dos vinhos de uma forma barata, simples e eficiente. Este método também foi eficaz na remoção de ácido acético na presença de altas concentrações de glucose, o que sugere que também pode ser utilizada para redução.

1.6 Nanofiltração

A **Nanofiltração** (NF) é uma tecnologia de separação de membrana impulsionada por pressão usada para separar os iões de uma solução. As membranas de NF foram estudadas e ficaram disponíveis a partir de 1980. Esta tecnologia utiliza membranas microporosas, com dimensões de poros que variam entre 0,001 a 0,01 μ . A nanofiltração está intimamente relacionada com RO dado que ambas as tecnologias são utilizadas para separar iões a partir de soluções. No entanto, as membranas de NF permitem que mais iões passem através delas do que uma membrana de RO. Por causa da rejeição mais baixa de sólidos dissolvidos, o aumento da pressão osmótica não é tão significativo com o sistema de NF como é com a RO, sendo assim, a NF opera a uma pressão mais baixa que RO (Kucera, 2010).

Tabela 1.1: Rejeição de iões por membranas de NF e RO (adaptado de Jane Kucera, 2010).

Espécie	Rejeição NF (%)	Rejeição RO (%)
Cálcio	75-98	93-99
Magnésio	70-98	93-98
Sódio	45-95	92-98
Cloreto	1-95	92-98
Sulfato	95-99	96-99
Bicarbonato	40-95	85-95
Fluoreto	25-95	92-95
Sílica	5-95	90-98
Total de sólidos dissolvidos	65-95	90-98

Neste método dá-se a passagem de um solvente (água) através de uma membrana semipermeável, contra o gradiente de concentração, por aplicação de uma pressão superior à pressão osmótica, na solução de maior concentração (vinho), forçando a água a atravessar a membrana na qual os sais ficam retidos. Considera-se por **retentado**, o fluxo de vinho que é retido na membrana e por **permeado**, o fluxo dos componentes de baixo peso molecular que passam através da membrana.

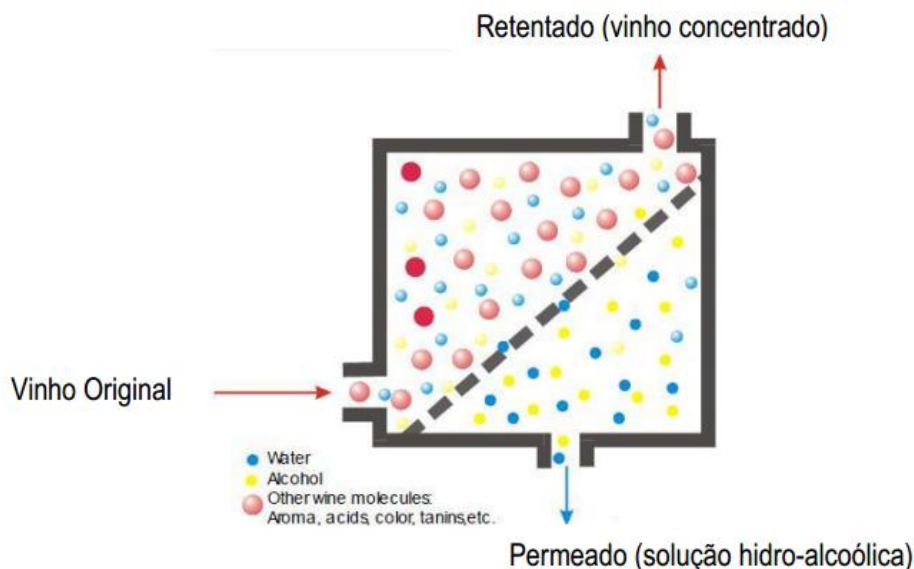


Figura 1.3: Esquema simplificado da obtenção do permeado e do retentado.

As membranas de NF são classificadas pelo corte (separação) do peso molecular, *molecular weight cut-off* (MWCO), este refere-se ao soluto de menor peso molecular que fica retido pela membrana em cerca de 90%.

Consideram-se quatro os processos de membrana: Osmose Inversa (RO), Nanofiltração (NF), Ultrafiltração (UF) e por último Microfiltração (MF). A **Osmose Inversa** é o processo com o tamanho de poro mais apertado possível em membranas de separação líquido/líquido. A água é, em princípio, o único material que passa através desta membrana e todo o material dissolvido e suspenso é rejeitado. A verdadeira Nanofiltração rejeita apenas iões com mais do que uma carga negativa (sulfato, fosfato), enquanto passam iões com carga única. A NF também rejeita materiais dissolvidos não carregados, carregados positivamente e iões de acordo com o tamanho e a forma da molécula em questão. A rejeição do NaCl varia entre 0-50%, dependendo da concentração da alimentação. A **Ultrafiltração** (UF) é um processo em que os compostos de alto peso molecular (HMWC), tais como proteínas, e os sólidos em suspensão são rejeitados, enquanto todos os compostos de baixo peso molecular (LMWC) passam através da membrana livremente. Por último, a **Microfiltração** (MF) é o processo em que apenas os sólidos suspensos são rejeitados (Wagner e Eng, 2001).

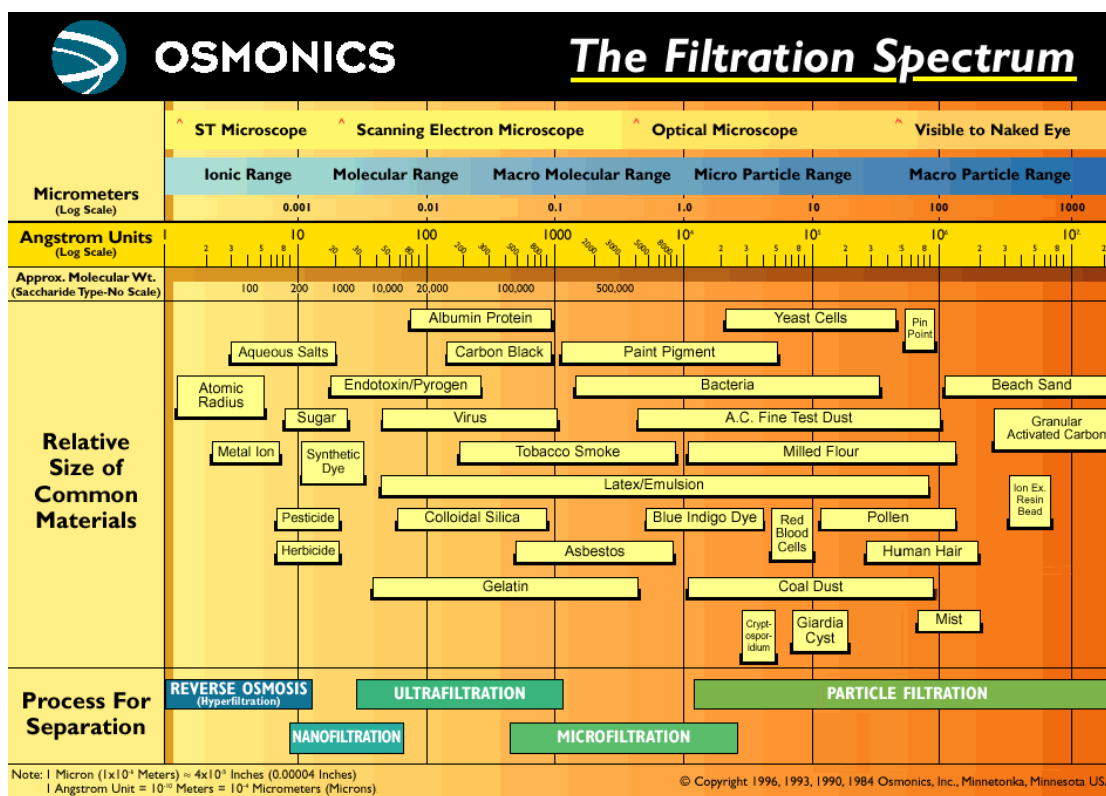


Figura 1.4: Classificação dos processos de filtração (Osmonics, Inc. 1996).

Escolhendo o tipo de filtração e a o tipo de membrana mais adequado, consegue-se separar várias moléculas do vinho de acordo com o seu peso molecular. Encontra-se na tabela 1.2 os pesos moleculares de alguns dos constituintes do vinho:

Tabela 1.2: Peso molecular de alguns constituintes do vinho, adaptado de Memstar, Wine membrane Technology.

Componentes do vinho	Peso molecular (Da)
Água	18
Dióxido de carbono	44
Acetaldeído	44
Etanol	46
Ácido acético	60
Acetato de etilo	88
Ácido láctico	90
Ácido málico	134
Ácido tartárico	150
Fenóis voláteis	120 a 150
Glucose/Frutose	180
Flavonoides	>300

Pela definição do MWCO é de esperar que exista uma maior retenção na membrana de constituintes como os compostos fenólicos, uma vez que apresentam um peso molecular superior ao MWCO da membrana de NF (cerca de 100Da). Os que apresentam valores próximos do MWCO da membrana de NF, como é o caso dos ácidos, é de esperar que parte deles fiquem retidos e outros permeiem. No caso da água e o do etanol deverão apresentar percentagens de permeação elevadas.

1.6.1 Tipos de membranas

Os tipos de membranas existentes classificam-se de acordo com a sua porosidade, índice de rejeição ao cloreto de sódio (essencial para a dessalinização da água salgada) e o material de construção. As membranas podem ser produzidas em poliamida (PA), difluoreto de polivinilideno (PVDF), politetrafluoretileno (PTFE), polietersulfona (mais comum), entre outros.

As membranas têm ainda duas configurações estruturais possíveis: simétrica e assimétrica. As primeiras são formadas por um material homogéneo, com estrutura de poro uniforme e sem camada de separação de topo densa e portanto tem dois lados da camada filtrante idênticos. As assimétricas por sua vez apresentam uma separação muito fina, possuem uma construção granulada, onde a estrutura dos poros vai diminuindo da zona de alimentação para a zona do filtro (Khulbe *et al.*, 2008).

1.6.2 Geometria dos módulos

As membranas, como já referido anteriormente, podem ser fabricadas a partir de vários materiais e geometrias. Existem quatro tipos de geometrias distintas: tubulares, planos ou de placas, enrolados em espiral e compostos por fibras ocas. A configuração em espiral é a mais utilizada em enologia.

- Módulos tubulares

Os módulos tubulares são formados a partir de várias membranas tubulares. As membranas tubulares são formadas a partir da deposição de um filme sobre a superfície interna de um tubo poroso. A utilização de módulos de membranas tubulares só é justificada quando há a necessidade de condições de escoamento bem controladas ou

quando a alimentação possui compostos suspensos capazes de danificar a superfície da membrana (Baker, 2004).

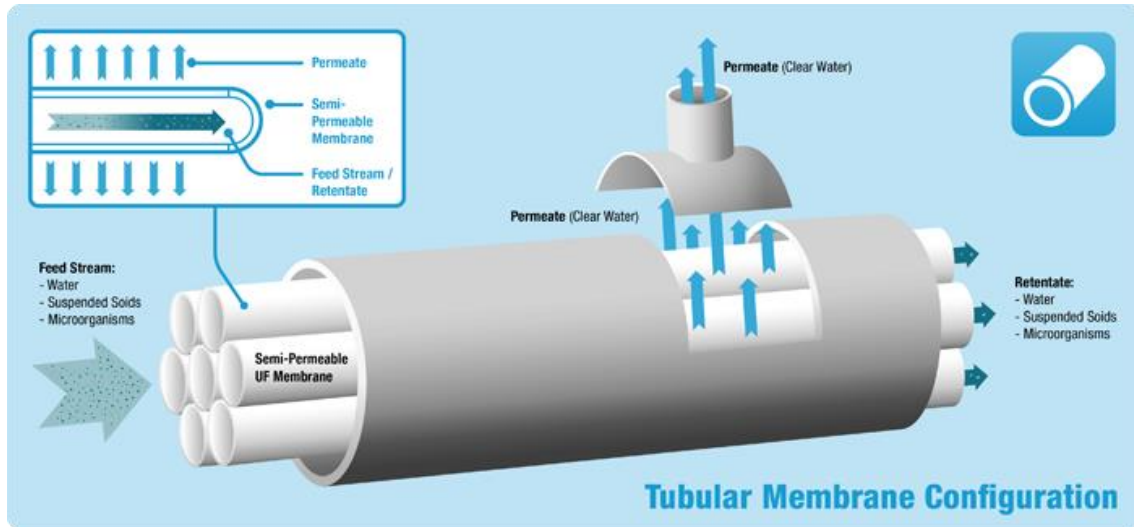


Figura 1.5: Esquema de uma membrana com módulos tubulares (Koch membranes).

- Módulos de Planos ou placas

As membranas planas formam uma configuração do tipo “*plate and frame*”, ou seja, são dispostas paralelamente, separadas por espaçadores e suportes porosos. Os espaçadores garantem o canal de escoamento e condições adequadas para transferência de massa. O suporte é utilizado para garantir a resistências das membranas quando estas são submetidas a diferenças de pressões elevadas (Baker, 2004).

- Módulos em espiral

Estes são formados por um conjunto de placas e quadros enrolados à volta de um tubo central e por espaçadores. A superfície lateral do tubo tem perfurações distribuídas paralela e axialmente ao longo deste, onde se inserem as membranas. Entre cada membrana encontra-se uma rede que impede o contacto entre elas. Neste caso, o fluxo circula tangencialmente enquanto o permeado vai ser recolhido num tubo central (Baker, 2004).

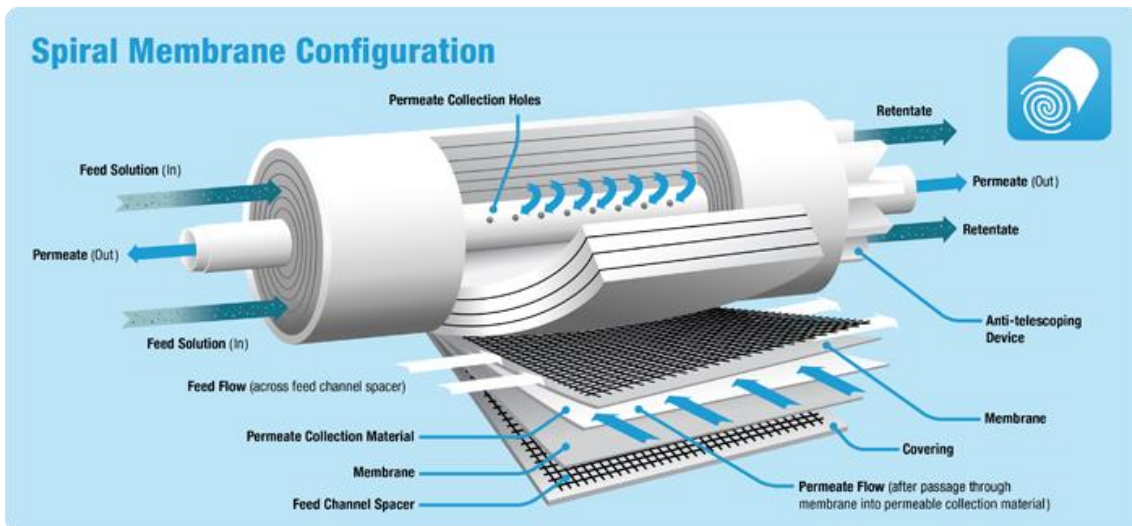


Figura 1.6: Esquema de uma membrana com módulos em espiral (Koch membranes).

- Módulos de fibras ocas

São formados por fibras existentes num invólucro, para permitir que o fluxo circule axialmente no seu interior. O permeado é, neste caso, recolhido entre as fibras e o invólucro. Estes módulos apresentam elevada densidade de empacotamento devido ao diâmetro dos tubos ser reduzido. As membranas são auto suportadas, reduzindo assim o custo de produção.

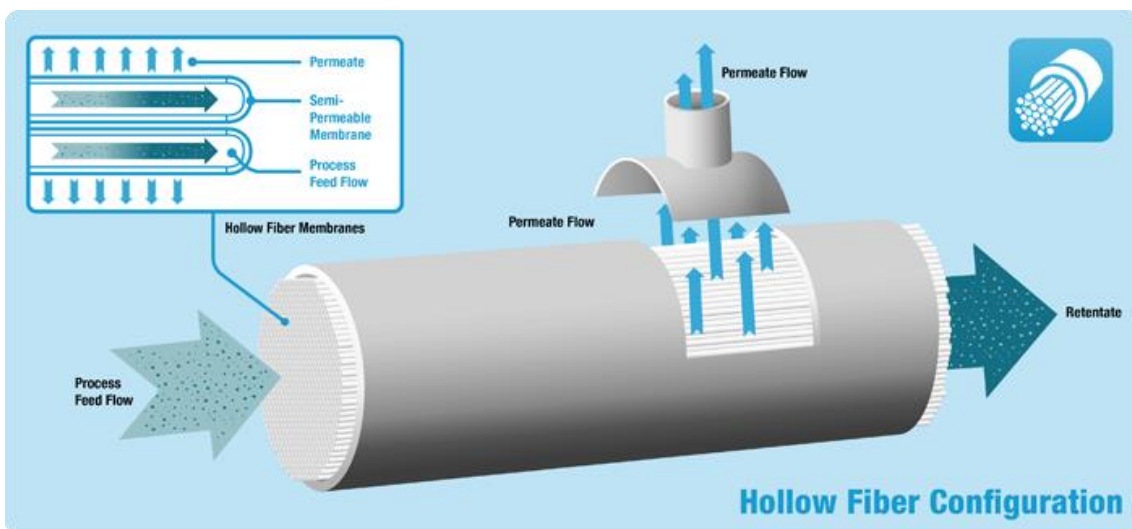


Figura 1.7: Esquema de uma membrana com módulos de fibra oca (Koch membranes).

1.6.3 Aplicações em enologia

A aplicação de técnicas de nanofiltração ou de osmose inversa ao vinho está maioritariamente relacionada com a concentração do vinho, aumento do teor de açúcar do mosto ou na desalcoolização do vinho.

Com o objetivo de ter um vinho com mais grau alcoólico, utiliza-se a nanofiltração para aumentar o teor de açúcares no mosto e assim após a fermentação alcoólica obtém-se um vinho com um grau alcoólico superior.

Com o intuito de reduzir a acidez volátil nos vinhos, faz-se a combinação da nanofiltração ou osmose inversa com resinas de **permuta aniónica**. Neste processo, o permeado obtido (que contém o ácido acético) é tratado com resinas aniónicas fracas, para remoção do ácido acético, e de seguida reincorporado ao vinho inicial.

O gosto a rolha (TCA-2,4,6-tricloroanisol) e o “suor de cavalo” (4-etilfenol) podem ser reduzidos pela combinação da nanofiltração com colunas de carvão desodorizante, sendo por fim reincorporado ao vinho inicial.

A remoção do ácido málico no mosto também é possível através de duas fases de nanofiltração. Na primeira consegue-se um permeado com água, ácido tartárico, ácido málico e vestígios de outros componentes do mosto. O permeado é novamente nanofiltrado para que o malato de potássio fique retido na membrana. Este permeado é reincorporado no mosto, reduzindo o teor de ácido málico presente no mosto.

A desalcoolização baseia-se na separação da água e do álcool, por osmose inversa, a partir do vinho, onde o permeado obtido é destilado e posteriormente reintroduzido no vinho a tratar, baixando o teor alcoólico.

A nanofiltração produz caudais superiores comparativamente com a osmose inversa. A nanofiltração torna assim o processo mais rápido, aumentando o caudal do permeado, o que leva a uma redução dos custos.

1.7 Permuta Iónica

1.7.1 Funcionamento da permuta iónica

A permuta iónica é realizada utilizando resinas de polímeros insolúveis, ativadas com vários grupos funcionais. O material polimerizado é normalmente baseado numa mistura de estireno e vinil benzeno. O radical ativo da permuta catiónica é geralmente ácido sulfónico (SO_3H) (ácido carboxílico também pode ser utilizado) e no caso da permuta aniónica o radical ativo é constituído por um amónio quaternário ou sal de amina terciária (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

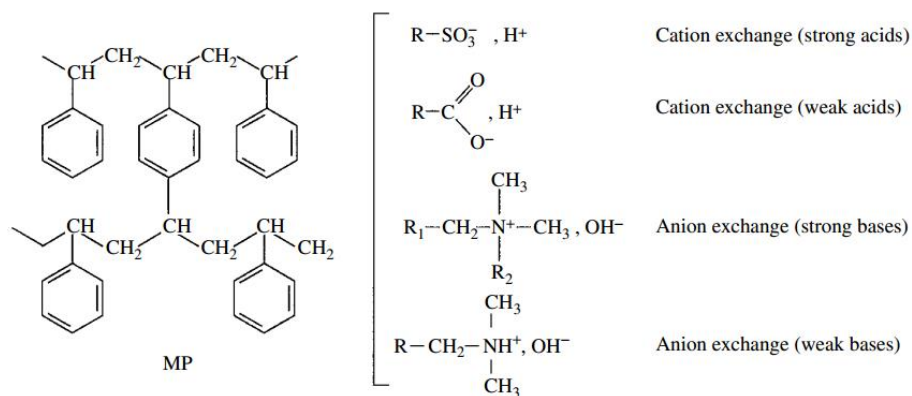


Figura 1.8: Composição da resina permutadora de iões. Vários grupos funcionais introduzidos num material polimerizado (MP, quatro unidades de estireno e uma unidade de vinil benzeno) para facilitar diferentes reações (Weinand e Dedardel, 1994).

A figura 1.8 mostra os dois tipos de permutador: permutador de troca catiónica, descrita como a acidificação se a resina liberta iões H^+ e permutadores de troca aniónica, o que pode levar a desacidificação se a resina liberta iões OH^- .

- A facilidade de permuta aumenta com a valência do permutador de iões: $\text{K}^+ < \text{Ca}^{2+} < \text{Al}^{3+}$. Isto significa que os iões divalentes presentes no vinho, como é o caso do cálcio e magnésio, são fixados na resina preferencialmente comparando com iões monovalentes de sódio e potássio.
- Se dois iões possuem a mesma valência, a facilidade da permuta aumenta com o número atómico. Potássio é fixado preferencialmente ao sódio.
- No caso dos metais pesados presentes no vinho, a capacidade de fixação na resina depende da estabilidade (constante de dissociação) do novo complexo formado pelo metal pesado e do permutador.

As resinas são definidas pela sua capacidade ou pela quantidade total de iões que podem ser mobilizados por unidade de massa do permutador. A utilização de resinas na produção de vinho deve atender a vários critérios: resistência mecânica, insolubilidade total no vinho e a ausência de “off-flavors”. Estas resinas também devem ter a capacidade de regeneração várias vezes. Para além da sua capacidade de permuta iónica, as resinas possuem uma estrutura microporosa, que lhe confere propriedades de absorção. Isto é muito útil na indústria agroalimentar, especialmente na eliminação de fenóis condensados (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.7.2 Aplicações na produção de vinho.

Desde a década de 1950 que se tentava desenvolver aplicações enológicas para permutadores de iões. No entanto, estas técnicas, na altura, foram rejeitadas pela França e CEE, por recomendação da OIV (Office International de la Vigne et du Vin).

Houve, no entanto a necessidade de fazer distinção entre:

- Permutador de catiões, que sejam susceptíveis de melhorar a estabilidade tartárica através da remoção de K^+ e Ca^{2+} , acidificação do vinho pela adição de H^+ e, eventualmente evitar casse férrica pela remoção de Fe^{3+} .
- Permutador de aniões, o que torna possível a redução da acidez volátil através da adição de OH^- , ou ainda para reduzir certos ácidos específicos (tartárico ou ácido acético). Há, no entanto, um risco de maiores alterações no sabor e composição.

Recentemente sugeriu-se a utilização de permuta aniónica na redução da acidez volátil (Oenovation Internacional Inc., USA). O vinho é tratado por osmose inversa para remover algum dos constituintes: água, álcool, ácido acético. A fração correspondente é passada através de uma resina de permuta aniónica para eliminar o ácido acético e, em seguida, com o retentado de vinho restante. Esta técnica torna-se muito eficaz, apenas uma parte do vinho passa através da resina de permuta aniónica, fazendo com que não haja diferenças organolépticas significativas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.7.3 Implementação prática das resinas de troca iônica

Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) sugeriram um procedimento para a utilização de resinas de troca iônica. Numa primeira fase procede-se à lavagem da coluna com água, seguida pelo segundo passo, a regeneração da coluna com cerca de 10 vezes o volume da resina, utilizando:

- a) 2-4% de H_2SO_4 OU 2-10% de HCl (ciclo ácido);
- b) Solução de NaCl a 10% (ciclo se sódio) ou
- c) Solução de MgCl_2 a 2,5% (ciclo de magnésio).

Para além da sua capacidade de troca iônica, as resinas podem absorver polifenóis e outros polímeros que afetam as suas capacidades de troca. As substâncias estranhas fixadas sobre a resina, são eliminadas por tratamento com hipoclorito de sódio. A coluna tem de ser enxaguada de novo, utilizando um volume de água representando 10 vezes o volume da coluna. O sistema é, posteriormente pronto para o tratamento do vinho. O vinho flui através da coluna de resina com um caudal na ordem de 10 vezes o volume da resina por hora. No final do ciclo a resina deve ser enxaguada com um volume de água igual a 5-10 vezes o volume da resina e novamente regenerada.

2. Materiais e Métodos

2.1 Escolha do Vinho

Inicialmente pretendia-se realizar este estudo com diversos vinhos para posterior comparação, contudo atualmente apenas existe na Falua-Sociedade de Vinhos SA um vinho com 4-etilfenol, apesar da acidez volátil não ser tão elevada como desejado. Sendo assim este estudo foi realizado num vinho tinto Tejo de 2013, com a casta Touriga Nacional.

Tabela 2.3: Análises físico-químicas realizada ao Vinho tinto inicial.

	Tejo 2013
Grau alcoólico (%)	13
Acidez Volátil (ác. Acético/L)	0,39
Acidez Total (ác. Tartárico/L)	5,33
pH	3,66
SO₂ livre (mg/L)	49
SO₂ total (mg/L)	105
Densidade corrigida	993,15
Extrato seco (g/L)	30,7
Intensidade Corante (IC)	10,9
Índice de Polifenóis Totais (IPT)	79,9
Antocianinas (mg/L)	560
Taninos (mg/L)	3793

2.2 Escolha das Membranas de Nanofiltração

As membranas utilizadas foram 4040-XN45-TSF da TriSep e a “O” da Vaslin-Bucher.

A XN45 é uma membrana de nanofiltração de poliamida com piperazina com 40" (1016 mm) de comprimento, 4" (101 mm) diâmetro, e 0,75" (19,1 mm) de diâmetro do tubo para o permeado e com um MWCO de cerca de 500 Da. A sua rejeição nominal é 10-30% para NaCl e superior a 90% para sacarose e MgSO₄.

Utiliza-se esta membrana com o intuito de desmineralização de solutos orgânicos, processamento de corantes e separações orgânicas.

Tabela 2.4: Resumo das características da membrana 4040-XN45-TSF.

Tipo de membrana	XN45 membrana de poliamida
Configuração	Em espiral
Área ativa da membrana (m²)	7,9
MWCO (Da)	500
Fluxo permeado (m³/dia)	7
Rejeição média de sal (%)	95
Rejeição mínima de sal (%)	92
Pressão recomendada (bar)	3 a 14
Pressão máxima (bar)	41
Temperatura de trabalho (°C)	2 a 45
Gama de pH	2 a 11
Fluxo de alimentação máxima (m³/h)	4,5
Turbidez máxima	1 NTU

2.3 Ensaio de Resinas

Foram testadas duas resinas diferentes, a Amberlite® XAD4, um adsorvente polimérico e a Amberlite™ IRA92 de poliestireno do tipo macroporosa (ficha técnica no anexo 1 e 2, respetivamente).

Tabela 2.5: Características Físico-químicas das resinas.

Designação	Amberlite XAD4	Amberlite IRA92
Matriz	Macroreticular Estireno-DVB gel	Poliestireno macroporosa
Tipo de resina	Fortemente ácida	Base fraca
Forma iónica	H ⁺	H ⁺
Grupos funcionais		Amina secundária
Forma física e aparência	Pérolas brancas translúcidas	Pérolas esféricas cor de marfim
Capacidade de troca total (eq/L)		≥ 1.60
Retenção de humidade (%)	54 a 60	40 a 50
Temperatura máxima de operação (°C)	150	90
Taxa de fluxo (BV/h)		5-30
Gama de pH	0 a 14	
Porosidade (mL/mL)	≥ 0.50	
Tamanho médio harmónico (mm)	0.49-0.69	0.580-0.780
Área de superfície (m²/g)	≥ 750	

2.3.1 Condições do ensaio laboratorial 1- membranas 4040-XN45-TSF

Conceberam-se seis colunas de teste, com uma altura de 40 cm e 2 cm de diâmetro interno, preenchidas com 50 ml da respetiva resina. Por cada resina realizaram-se três repetições.



Figura 2.9: Colunas de ensaio da resina fenólica (XAD4, à esquerda) e aniónica (IRA92 à direita).

As resinas foram previamente hidratadas com água em dez vezes o seu volume (10 bv), durante 24 horas. De seguida, procedeu-se à regeneração das colunas com um volume dez vezes superior, de uma solução de HCl 0.1N (diluição 1:10) no caso da Amberlite XAD4 e uma solução de NaOH 2N no caso da Amberlite IRA92 durante 12 horas. Por último foram lavadas com água destilada de modo a controlar o pH, garantindo que a solução tenha sido totalmente removida de modo a assegurar as condições originais.

Foi utilizada como solução o permeado (solução hidro-alcoólica) retirado do processo de Nanofiltração, num total de 9000 mL por resina, que se fez correr pelas colunas durante as seis horas de ensaio (num total de 18000 mL no final). Para esta parte do processo foi utilizado o equipamento OSMOTOP 300 da Vaslin Bucher, distribuído pela Somavil (Alenquer), com 8 membranas TriSep, 4040-Xn45-TSF de nanofiltração.

O caudal das colunas foi corrigido para 10 bv/h, ou seja, 500 mL/h, e as amostras recolhidas de hora a hora, durante as seis horas seguintes (60 bv).

2.3.2 Condições do ensaio laboratorial 2- membranas “O”

Mantiveram-se as condições do ensaio 1 com a exceção de que apenas foi utilizado a resina Amberlite™ IRA92 e as 8 membranas TriSep, 4040 Xn45 TSF foram substituídas por 8 membranas “O”. Assim no final apenas um total de 9000 mL (pelas 3 réplicas da resina).



Figura 2.10: Colunas do ensaio da resina Amberlite™ IRA92.

Ambos os ensaios (1 e 2) foram colhidas amostras do vinho testemunha, do permeado, do retentado, do vinho final (junção do testemunha + permeado + retentado) e de ambas as resinas (amostra de hora a hora de cada réplica), para análise sumária (Teor Alcoólico, Acidez Total, Acidez Volátil, pH, Extrato Seco, Sulfuroso Livre e Total), análise da Intensidade Corante (IC), Índice de Polifenóis Totais (IPT), Antocianinas e Taninos.

Foram ainda recolhidas amostras do vinho testemunha, do permeado, do retentado, do vinho final, da junção de cada hora do triplicado da resina Amberlite® XAD4 para análise do 4-etilfenol e 4-etilgualicol. Estas análises foram efetuadas pelo

CIATE- Universidade Católica Portuguesa- Escola Superior de Biotecnologia por falta do respetivo equipamento (cromatografia gasosa).

2.4 Ensaio Industrial – Fundamento teórico

Não foi possível realizar os Ensaios à escala Industrial devido a problemas de logística (atraso na chegada do equipamento).

Seria utilizado o equipamento OSMOTOP 300, da Vaslin Bucher, com as 8 membranas Trisep, 4040-XN45-TSF de nanofiltração e as 8 membranas “O”, ao qual seria acoplado uma coluna de 75 litros de resina aniónica e num segundo ensaio 75 litros de resina fenólica. Os ensaios seriam efetuados novamente em triplicado como nos ensaios laboratoriais.

A nanofiltração funcionaria a 30 bar de pressão, com um caudal de permeado de 500L/h, equivalente a 10 bv/h.

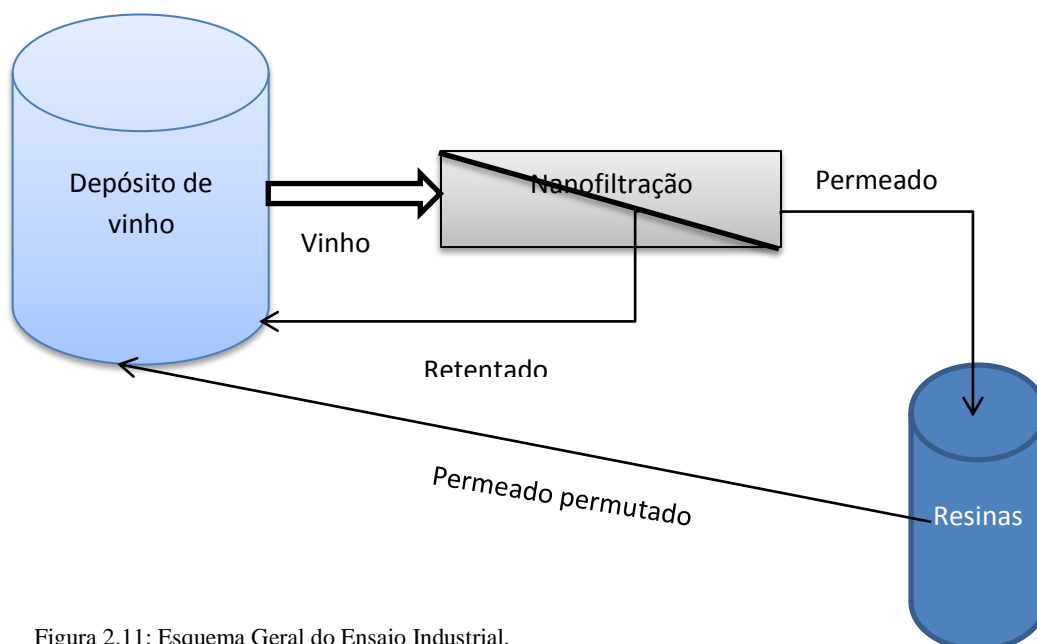


Figura 2.11: Esquema Geral do Ensaio Industrial.

Seriam novamente colhidas amostras do vinho testemunha, do permeado, do retentado, do vinho final (junção do testemunha + permeado + retentado) e de ambas as resinas (amostra de hora a hora de cada réplica), para análise sumária (Teor Alcoólico, Acidez Total, Acidez Volátil, pH, Extrato Seco, Sulfuroso Livre e Total), análise da Intensidade Corante (IC), Índice de Polifenóis Totais (IPT), Antocianinas e Taninos. Também seriam colhidas amostras do vinho testemunha, do permeado, do retentado, do

vinho final, da junção de cada hora do triplicado da resina Amberlite® XAD4 para análise do 4-etilfenol e 4-etilgualicol. Estas análises também realizadas no exterior do laboratório da Falua-Sociedade de vinhos, SA.

2.5 Determinações analíticas – Análises Físico-químicas

As análises foram realizadas no laboratório do grupo João Portugal Ramos, na Falua- Sociedade de Vinhos, SA, em Almeirim.

2.5.1 Teor Alcoólico

O teor alcoólico foi determinado por ebulliometria. Este método baseia-se na determinação da temperatura de ebulição do vinho (intermédia entre a da água e a do etanol, a uma pressão de 1atm) diretamente relacionada e dependente do respetivo teor alcoólico em volume. A temperatura de ebulição da amostra é convertida em teor alcoólico em volume, com o auxílio do disco de conversão (NP 2143, 1987).



Figura 2.12: Ebulliómetro utilizado para determinação do teor alcoólico.

2.5.2 Acidez Volátil

A acidez volátil é determinada por destilação em Casenave-Ferré, seguindo o protocolo interno do controlo de qualidade da Falua- Sociedade de Vinhos, SA. Os ácidos voláteis são arrastados por uma corrente de vapor de água, seguidos de

retificação, condensação e titulação, utilizando como indicador a fenolftaleína (Delanoe *et al.*, 1997), (NP-2140, 1987).

Depois de obtido o destilado, procede-se a duas titulações sendo o resultado obtido através da seguinte fórmula (1) em que v_1 e v_2 são o volume de titulado da primeira e segunda titulação, respetivamente:

$$\text{Acidez Volátil (g. ácido acético/L)} = 0,6 \times (v_1 - (v_2 \times 0,1))$$

(1)



Figura 2.13: Cazenave-Ferré utilizado para determinação da acidez volátil.

2.5.3 Acidez Total

A determinação da acidez total consiste numa titulação ácido-base. Este método baseia-se na neutralização dos ácidos através de uma solução alcalina, na presença do indicador azul de bromotimol (NP-2139, 1985).



Figura 2.14: Determinação da acidez total por titulação com NaOH 0.1M.

Depois de titulado segue-se o seguinte cálculo (2), em que v é o volume do titulado:

$$\text{Acidez Total (g. ácido tartárico/L)} = v \times 0,75$$

(2)

2.5.4 pH

Entende-se por pH ou acidez real a disponibilidade de íões H^+ no vinho. A determinação do pH é feito pelo método potenciométrico (pH Meter GLP 21, Crison), tem como fundamento teórico a determinação da diferença de potencial entre um eletrodo de referência com o potencial conhecido e um eletrodo de medida.

2.5.5 SO₂ livre

O doseamento do SO₂ livre é titulado no Iodomatic, da Dujardin-Salleron. Consiste na titulação iodométrica direta em meio ácido com dedução das outras substâncias oxidáveis (NP-2220, 1987). Adiciona-se 5 mL de H₂SO₄ á amostra a analisar e titula-se no Iodomatic com KiO₃.



Figura 2.15: Doseamento do SO₂ livre pelo Iodomatic.

2.5.6 So₂ Total

O sulfuroso total é a junção do sulfuroso livre com o combinado (acetaldeído, ácidos cetónicos, açucars e derivados, etc). Quantifica-se também pelo

iodomatic mas com um passo a mais no procedimento. Adiciona-se 4 mL de NaOH 2N, deixa-se a repousar durante 10 min, depois dito adiciona-se então os 5mL de H₂SO₄ e titula-se no Iodomatic.

2.5.7 Densidade Corrigida

A determinação da densidade corrigida é feita por aerometria com a correção da massa volúmica para uma temperatura de 20 °C (NP-2142,1986).

2.5.8 Extrato Seco

O extrato seco corresponde às substâncias não voláteis do vinho, medidas em determinadas condições que o submetem o menos possível a alterações (Delanoe *et al.*, 1997).

Após determinação da densidade da amostra procede-se à conversão em Extrato Seco por meio de tabelas auxiliares.

2.5.9 Intensidade corante (IC)

A IC é quantificada pelo método espectrofotométrico, no qual são lidas as densidades óticas a 420, 520 e 620 nm.

Depois da leitura procede-se ao cálculo da Intensidade Corante (3):

$$\text{Índice de cor (IC)} = DO(280) + DO(320) + DO(520)$$

(3)

2.5.10 Índice de Polifenóis Totais (IPT's)

Os IPT's são também calculados por espectrofotometria, com a leitura efetuada a 280 nm, com a seguinte fórmula (4):

$$\text{Índice polifenóis totais (IPT)} = \text{factor de diluição (100)} \times DO(280)$$

(4)

2.5.11 Antocianinas

As antocianinas foram calculadas pelo método proposto por Puissant-León (*Blouin J. Techniques d'analyses des moûtes et des vins. Ed.Dujardin Salleron, Paris. 1992*), segundo a fórmula (5):

$$\text{Antocianinas (mg/L)} = 100 \times (22,76 \times DO(520))$$

(5)

2.5.12 Taninos

Tal como as antocianinas, os taninos foram calculados segundo o método proposto por Puissant-León (*Blouin J. Techniques d'analyses des moûtes et des vins. Ed.Dujardin Salleron, Paris. 1992*), aplicando a fórmula seguinte (6):

$$\text{Taninos (mg/L)} = 100 \times 76 \times (DO(280) - 0,6 \times DO(520) - 0,4 \times (DO(320) - 0,2 \times DO(520)))$$

(6)



Figura 2.16: Espectrofotómetro utilizado (Labda 25, UV/VIS Spetrometer; Perkin Elmer).

3. Resultados e Discussão

- **Fenóis voláteis**

A tabela 3.6 mostra o comportamento da membrana através dos resultados do Vinho original, Permeado e Retentado. Verifica-se que temos uma boa permeação da membrana. O 4-etilfenol foi praticamente todo Permeado, não havendo diferenças significativas na sua concentração entre o vinho original e o Permeado, traduzindo a boa eficácia desta membrana.

Relativamente ao resultado do 4-etilguaicol a membrana não possuiu um comportamento tão bom contudo suspeita-se de um erro de análise no Permeado, uma vez que, no Retentado a quantidade de 4-etilguaicol mantém-se igual à do vinho original.

Relativamente à permuta das resinas fenólicas todas as réplicas viram os seus valores de 4-etil-fenol e 4-etilguaicol reduzidos a zero. Demonstra-se assim, que todo o 4-etilfenol e 4-etilguaicol presente no Permeado (solução hidro-alcoólica que passou pela permuta) foram fixados na resina. As resinas funcionaram com eficácia na eliminação do 4-etilfenol e 4-etilguaicol.

Tabela 3.6: Resultados dos Fenóis Voláteis presentes no vinho a análise obtidos através da Cromatografia Gasosa.

	4-etilfenol	4-etilguaicol
Vinho original	0,59	0,21
Permeado	0,54	0,15
Retentado	0,54	0,21
XAD4 R1	0	0
XAD4 R2	0	0
XAD4R3	0	0

Analisou-se o comportamento da resina pela sua Taxa de Retenção durante as 6 horas de trabalho.

Para calcular a Taxa de Retenção (Equação 7) recorreu-se ao Índice de Polifenóis Totais (IPT) como relação direta de todos fenóis do meio. Para tal utilizou-se o valor médio do IPT das três réplicas em cada hora de permuta, em relação ao valor de IPT original no Permeado.

No Anexo 4 encontra-se tabelado o valor do Índice de Polifenóis Totais obtido durante o tempo de permeação em cada resina. À média das três réplicas corresponde a respectiva Taxa de retenção.

$$\text{Taxa de Retenção (\%)} = \left(1 - \left(\frac{\text{média do IPT por hora}}{\text{valor de IPT do permeado}} \right) \right) * 100$$

(7)

A figura 3.17 representa a capacidade de retenção da resina fenólica (XAD4) no decorrer das 6 horas de trabalho. Pode-se observar que inicialmente tem-se uma retenção de cerca de 83%, o que se traduz numa correta fixação na coluna. A partir da segunda hora até à quinta hora há um pequeno decréscimo de 70% para 63%. Enquanto a partir da quinta hora há uma descida acentuada para cerca de 50% de capacidade de retenção, este valor diz-nos que a coluna já não consegue manter uma capacidade de fixação favorável. Neste caso para continuar a utilizar a coluna a partir da quinta hora teríamos de fazer uma nova regeneração da coluna.

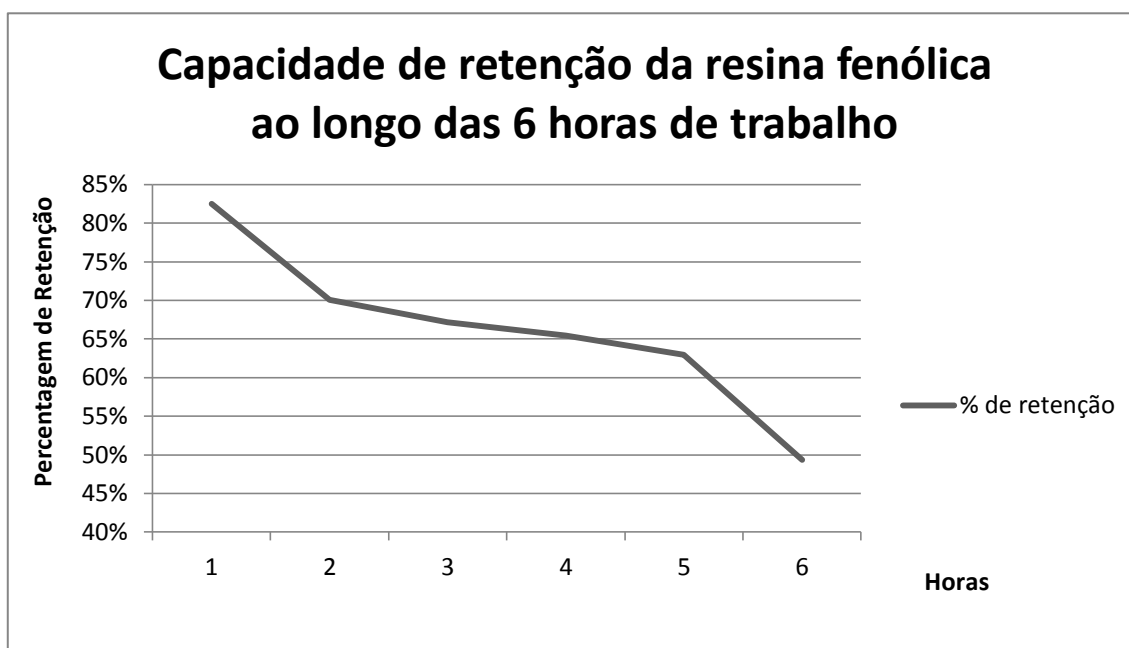


Figura 3.17: Capacidade de retenção da resina fenólica (XAD4) ao longo das 6 horas de trabalho.

- **Acidez volátil**

No fim da realização do ensaio 1 procedeu-se às análises sumárias das amostras, das quais resultaram os valores apresentados na tabela 7. Ao fazer uma primeira análise aos resultados reparou-se que as membranas 4040-XN45-TSF utilizadas na nanofiltração tiveram uma elevada permeação de ácido tartárico e de ácido acético.

Da utilização destas membranas obtém-se um permeado rico em ácido acético, mas também rico em ácido tartárico. A desacidificação deste permeado, para além de rapidamente saturar as resinas aniónicas, vai provocar uma excessiva desacidificação do próprio vinho, em contraponto à pretendida redução seletiva de ácido acético.

Como o presente estudo tinha também como objetivo reduzir apenas a acidez volátil substituiu-se as membranas 4040-XN45-TSF pelas membranas “O”.

Com a utilização das membranas “O” originou-se o ensaio 2 para verificar se haveria melhorias nos resultados, pela permeação seletiva do ácido acético e retenção do ácido tartárico.

Tabela 3.7: Resultados das análises sumárias relativamente à acidez volátil nas amostras com a utilização da membrana de nanofiltração.

Membranas 4040-XN45-TSF							
Amostra	Grau alcoólico (%)	Acidez Volátil (g_{ác.} Acético/dm³)	Acidez Total (g_{ác.} Tartárico/dm³)	pH	SO₂ livre (mg/l)	SO₂ Total (mg/l)	Extrato seco (g/l)
Vinho Inicial	13	0,39	5,33	3,66	49	105	30,7
Permeado	12,2	0,35	2,85	3,88	23	26	12,1
Retentado	12,3	0,35	5,77	3,63	54	87	32,8
IRA92 R1	11,8	0,24	0,67	4,95	15	10	9,3
IRA92 R2	11,8	0,23	0,57	3,94	15	15	9
IRA92 R3	11,8	0,23	0,51	4,92	13	15	12,6

As membranas “O” utilizadas, são membranas de osmose inversa. Tal como no ensaio 1, neste ensaio procedeu-se do mesmo modo. Contudo estas membranas retiram alguma cor ao vinho o que por consequência dá alguma cor á solução hidro-alcoólica.

Tabela 3.8: Resultados das análises sumárias relativamente á acidez volátil nas amostras com a utilização da membrana de osmose inversa.

Membranas "O"							
Amostra	Grau alcoólico (%)	Acidez Volátil (gác. Acético/dm ³)	Acidez Total (gác. Tartárico/dm ³)	pH	SO ₂ livre (mg/l)	SO ₂ Total (mg/l)	Extrato seco (g/l)
Vinho Inicial	13	0,41	5,4	3,62	26	97	31,8
Permeado	9,2	0,26	0,9	4,39	20	15	4,9
Retentado	13	0,36	5,4	3,64	61	84	31,5
IRA92 R1	8,9	0,12	0,4	7,14	18	10	4,4
IRA92 R2	8,9	0,07	0,3	7,14	13	15	3,6
IRA92 R3	8,9	0,54	0,3	7,49	20	15	3,1

A membrana de nanofiltração apresenta uma permeação de 0,35 g_{ác.acético}/dm³ no entanto também permeia 2,9 g_{ác.tartárico}/dm³. Ao passar o permeado nas resinas estas vão ficar saturadas com ácido tartárico acabando por deixar passar grande quantidade da acidez volátil. Sendo assim, no final teria uma redução da acidez total e não da acidez volátil como pretendido. Enquanto na utilização da membrana de osmose inversa, temos uma capacidade de retenção elevada para o ácido tartárico, passando maioritariamente ácido acético que é depois eliminado na permuta de resinas aniónicas. Assim sendo, neste estudo a membrana de osmose inversa seria a seleccionada para a redução da acidez volátil, apresentando uma menor desacidificação do vinho.

Tabela 3.9: Seleção da membrana a utilizar para a redução da acidez volátil através da observação do comportamento da membrana.

Observação do Comportamento das Membranas		
	Acidez Volátil (g _{ác.} Acético/dm ³)	Acidez Total (g _{ác.} Tartárico/dm ³)
Original	0,41	5,4
Nanofiltração	0,35	2,9
Osmose Inversa	0,26	0,9

Para calcular a Taxa de Retenção (Equação 8) no caso da acidez volátil recorreu-se ao valor da acidez volátil (AV). Para tal utilizou-se o valor médio da AV das três réplicas em cada hora de permuta, em relação ao valor da AV original no Permeado.

$$\text{Taxa de Retenção (\%)} = \left(1 - \left(\frac{\text{média da acidez volátil por hora}}{\text{valor da acidez volátil do permeado}} \right) \right) * 100$$

(8)

No Anexo 4 encontra-se tabelado o valor da acidez volátil obtido durante o tempo de permeação em cada resina. À média das três réplicas corresponde a respectiva Taxa de retenção.

Relativamente à capacidade de retenção da resina aniónica (IRA92) pode ser observada através da figura 3.18. A resina tem uma capacidade de fixação inicial de cerca de 69%. Da primeira até à terceira hora verifica-se um decréscimo de 12% (56%). A partir da quarta hora a capacidade de retenção desce até aos 32%, uma taxa de retenção não desejável uma vez que nestas condições a resina não se encontra a trabalhar nas condições desejadas (capacidade de fixação da resina inferior a 50%, o rendimento da coluna já não é favorável). Assim para a utilização desta resina mantendo estas condições de trabalho seria necessário efetuar a regeneração da coluna a partir da quarta hora de trabalho.

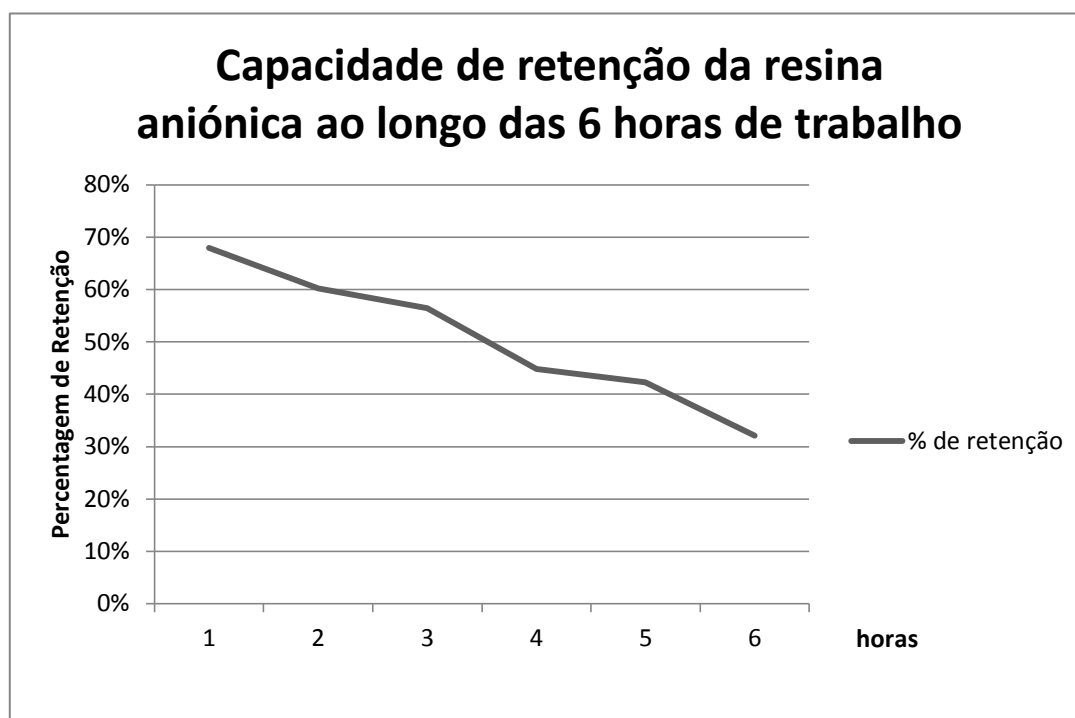


Figura 3.18: Capacidade de retenção da resina aniónica (IRA92) ao longo das 6 horas de trabalho.

4. Conclusões

O estudo com as membranas de nanofiltração 4040-XN45-TSF da TriSep acopladas à resina fenólica Amberlite® XAD4 revelou-se bastante eficaz na eliminação do 4-etilfenol e 4-etilguaicol. A resina tem uma capacidade de fixação inicial de cerca de 85% com uma duração laboral de cinco horas antes de necessitar uma nova regeneração uma vez que a partir da quinta hora a resina encontra-se saturada.

Contudo, para a remoção da acidez volátil, as membranas de nanofiltração 4040-XN45-TSF da TriSep com a resina aniónica Amberlite™ IRA92 não funcionaram como desejado uma vez que estas membranas têm uma boa afinidade para o ácido tartárico e ácido acético.

Com a aplicação das membranas de osmose inversa “O” acopladas à resina aniónica Amberlite™ IRA92 verificou-se que seriam mais adequadas para a redução da acidez volátil comparativamente com as membranas de Nanofiltração. Contudo, esta resina apenas tem uma capacidade de retenção inicial de 68% e a partir da quarta hora de trabalho já necessita de uma regeneração da coluna.

Apesar de a Nanofiltração ser um processo mais caro e de maiores custos de investimento que apenas a utilização direta de uma permuta quer aniónica ou fenólica, tem a vantagem de separar o vinho em duas fases e permitir uma remoção mais seletiva, logo com menor impacto na matriz do vinho. Para além disso, é um equipamento bastante versátil que pode ser utilizado em processos de estabilização tartárica, desalcoolização, remoção de off-flavours, entre outros.

Futuramente seria importante estudar este processo de nanofiltração com aplicação de resinas aniónicas diferentes, a fim de selecionar uma com uma maior capacidade de fixação do ácido acético com o objetivo de reduzir os valores da acidez volátil.

Devido aos bons resultados apresentados neste estudo para a remoção do 4-etilfenol e 4-etilguaicol seria de todo interesse numa fase posterior aplicar este processo à escala industrial e avaliar o potencial benefício organoléptico.

Seria ainda relevante a aplicação deste processo em estudos para remover o tricloroanisol (2,4,6-tricloroanisol, TCA), responsável pelo gosto a rolha, e outros fenóis voláteis.

Este estudo é de grande relevância em anos de grandes chuvas, onde existe uma grande quantidade de uvas podres em consequência de contaminações por *Brettanomyces/Dekkera*. A Falua-Sociedade de vinhos, SA tem como principio a produção de vinhos de grande qualidade e de renome, como tal, a mínima contaminação existente tem de ser eliminada a fim de não haver propagação.

A contaminação existente ou a propagação que daí advenha levaria a que o prejuízo fosse de grande impacto para a Empresa. Uma vez que, a pequena quantidade de cada casta se traduz em grandes vinhos aveludados e de qualidade. A nível sensorial existiriam alterações drásticas que levariam a não comercialização deste vinho, e por consequência perdas económicas.

E ainda importante realçar que este método permite a remoção seletiva dos constituintes dos vinhos de qualidade através de pequenos ajustes de membranas ou resinas.

5. Bibliografia

Baker, R.W. (2004) Membrane Technology and Applications. 2nd edition. John Wiley & Sons.

Bely M, Rinaldi A, Dubourdieu D. (2003). Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *journal bioscience bioengineering* 96: 507–512.

Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarede, I. and Dubourdieu D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122: 312–320.

Bertrand, A. (1981). Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité des vins. *Colloq Soc. Fr. Microbiol, Reims*: 251-267.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (1996). Principles and practices of winemaking. New York: Chapman and Hall.

Calderón, F., Morata, A., Uthurry, C., and Suárez, J. A. (2004). Aplicaciones de la ultrafiltración en la industria enológica. *Ultimos avances tecnológicos. Tecnología del vino*, 16, 49–54.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N. and Pons, M.. (1992a). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of Science Food Agriculture*, 165 -178.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., and Boidron, J. N. (1992b). Le caractère phenol des vins rouges: caractérisation, origine et moyens de lute. *Revue Française d'Oenologie* 138: 21-24.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D. and Boidron, J. N. (1989). Incidence de certains facteurs sur la decarboxylation des acides phenols per la levure. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 23: 59-62.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., and Boidron, J. (1995). The influence of *Dekkera/Brettanomyces* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 463–468.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., & Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 101–202.

Chatonnet, P., Boidron, J., and Dubourdieu, D., (1993b). Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur le teneur en acide acétique et en ethyl-phenols. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. 27, 277–298.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N. and Barle, C. (1993c). Origines et incidences organoléptiques de phenols volatils dans les vins. Application a la maîtrise de la vinification de l'élevage. In: *Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins*, Revue Française d'Oenologie, Lattes, France.

Chatonnet, P., and Pons, M. (1990). Elevage des vins rouges futs de chene: evolution de certains composés volatiles et de leur impact aromatique. *Science des Aliments*, 565-587.

Chatonnet, P., Viala, C., and Dubourdieu, D. (1997). Influence of polyphenol components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 463–468.

Cordente AG, Cordero-Bueso G, Pretorius IS and Curtin CD. (2013). Novel wine yeast with mutations in YAP1 that produce less acetic acid during fermentation. *FEMS Yeast Research* 13:62–73.

Couto, J. A., Barbosa, A., and Hogg, T. (2005). A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Letters in Applied Microbiology*, 41(6), 505-510.

Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., and Ferreira, V. (2004). Gas chromatography–olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1653–1660.

Deak, T., and Beuchat, L.R., (1996). *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Boca Raton, USA.

- Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., and Ambro, S. (2002). Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5605–5611.
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., and Malfeito-Ferreira, M. (2003a). Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology* 20: 567–574.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2003b). Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology*, 20, 377–384.
- Divol, B., Strehaino and Lonvaud-Funel, A. (2005). Effectiveness of dimethylcarbonate to stop alcoholic fermentation. *Food Microbiology* 22: 169-178.
- Du Toit W. (2002). Winemaking with rotten grapes: It can be a headache. Wynboer, a technical guide for wine producers.
- Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., and Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 862–871.
- Edlin, D. A. N., Narbad, A., Dickinson, J. R., and Lloyd, D. (1995). The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS-Microbiology Letters*, 125, 311–316.
- Egli, C. M., and Henick-Kling, T. (2001). Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 241–247.
- Erasmus, D.J., Cliff, M., and van Vuuren H. J. J. (2004). Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of ice wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 55 (4):371–378.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP análisis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcriber spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329–337.

- Fariña, L., Boido, E., Carrau, E. and Dellacassa, E. (2007). Determination of volatile phenols in red wine by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 1157: 46-50.
- Freer, S. N., Dien, B., and Matsuda, S. (2003). Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 101–105.
- Freer, S. N., Dien, B. S., Matsuda, S. and Rothast, R. J. (2000). Acetic acid production by *Brettanomyces* yeast. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology (vol. 100, p. 503).
- Fugelsang, K. C. (1996). *Wine microbiology*. The Chapman & Hall Enology Library. New York.
- Fugelsang, K. (1998). *Brettanomyces*: Dr Jekyll ou Mr. Hyde des vins? *Biofutur*, 182, 22–23.
- Fugelsang, K. and Edwards, C. (2007). *Wine microbiology*. Springer, Berlin
- Fugelsang, K. C., and Zoecklein, B. W. (2003). Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 294–300.
- Gerbeaux, V., Jeudy, S., and Monamy, C. (2000). Study of phenol volatiles in Pinot noir wines in Burgundy. *Bulletin de l'OIV*, 73, 581–599.
- Gerbeaux, V., Vincent, B., and Bertrand, A. (2002). Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot Noir wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 131–137.
- Gómez-Rivas, L., Escudero-Abarca, B. I., Aguilar-Uscanga, M. G., Hayward-Jones, P. M., Mendoza, P., and Ramírez, M. (2004). Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 16–22.
- González-Arenzana, L., Santamaría, P., López, R., Garijo, P., Gutiérrez, A.R., Garduño-Cerdán, T., and López-Alfaro, I. (2013). Microwave technology as a new tool to

improve microbial control of oak barrels: A preliminary study. *Food Control* 30: 536-539.

Guillen, A., Kechinski, C. and Manfroi, V. (2010). The use of ozone in a CIP system in the wine industry, *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association*, 32 (5): 355–60.

Guzzon, R., Nardin, T., Micheletti, O., Nicolini, G., and Larcher, R. (2013). Antimicrobial activity of ozone. Effectiveness against the main wine spoilage microorganisms and evaluation of impact on simple phenols in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19: 180–188.

Henick-Kling, T., Egli, C., Licker, J., Mittrakul, C. and Acree, T. E. (2000). In *Proceedings of the 5th international symposium on cool climate viticulture and oenology*, Melbourne, Australia, 16–20.

Heresztyn, T. (1986). Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 127–132.

Heresztyn, T. (1986a). Metabolismo of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Archives of Microbiology* 146: 96-98.

Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdigones, F., and Jiménez, J.. (1996). Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry ya nested PCR method *Applied and Environmental Microbiology* 62: 998–1003.

Kelly, J. 2003. What is *Brettanomyces* and why are so many winemakers concerned about it? *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 474, 54–57

Khulbe, K.C., Feng, C.Y., and Matsuura, T. (2008) *Synthetic Polymeric Membranes: Characterization by atomic Force Microscopy*. Springer, Germany.

Kiskó, G., Sharp, R., and Roller, S. (2005). Chitosan inactivates spoilage yeasts but enhances survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 872–880.

- Kladre, M. A., Yousef, A. E. and Kim, J.-G. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *JFS: Concise Reviews in Food Science. Journal of food science* vol. 66, no. 9: 1242-1252
- Kucera, J. (2010). *Reverse Osmosis – Industrial Applications and Processes*. John Wiley & Sons, New Jersey and Scrivener Publishing, Massachusetts.
- Kurtzman, C., and Fell, J. W. (2000). *The yeasts, a taxonomic study* (4th ed.). Amsterdam: Elsevier Science Publisher BV.
- Laureano, P., D'Antuono, I., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2004). Effect of different sanitation treatments on the population of *Dekkera bruxellensis* recovered from the wood of barrels (in Portuguese). *Enologia* 43 (44):3–8.
- Loureiro, V., and Malfeito-Ferreira, M. (2006). *Food spoilage microorganisms*. Boca Raton: Woodhead Publishing.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Les aspects microbiologiques de l'élevage des vins rouges en barriques. 5^eme Colloque des Sciences et Techniques de la Tonellerie. *Connaissances actuelles et avenir de l'élevage en barriques*, 47 – 51.
- Lonvaud-Funel, A., and Renauf, V. (2005). Incidence microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ou de barriques usagées. *Revue Française d'Oenologie*, 211, 10 – 14.
- Lustrano, G., Vigentini, I., De Leonardis, A., Alfano, G., Tirelli, A., Foschino, R. and Ranalli, G. (2010). Inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera bruxellensis* using low electric current treatment (LEC). *Journal of Applied Microbiology* 109: 594-604.
- Luo, Z., Walkey, C. J., Madilao, L. L., Measday, V. and Van Vuuren, H. J. J. (2013). Functional improvement of *Saccharomyces cerevisiae* to reduce volatile acidity in wine. *REMS yeast research* 13: 485-494.
- Malfeito-Ferreira, M. (2005). Avances recientes en el control de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* en vinos. In *Enotour 2005 Agrovin*, Zaragoza, Spain, 28–30 June.
- Malfeito-Ferreira, M., Tareco, M., and Loureiro, V. (1997). Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 143–155.

- Malfeito-Ferreira, M., Rodrigues, N., and Loureiro, V., (2001). The influence of oxygen on the 'horse sweat taint' in red wines. *Italian Food and Beverage Technologies*, 24, 34–38.
- Malfeito-Ferreira, M. (2010). Yeasts and off-flavours: a technological perspective. *Annals of Microbiology*, 61:95-102.
- Mansfield, A. K., Zoecklein, B. W., and Whiton, R. S. (2002). Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 303–307.
- Massot, A., Mietton-Puechot, M., Puechot, and Milisic, V. (2008). Nanofiltration and Reverse Osmosis in Winemaking. *Desalination*, 231: 283-289.
- Moreno-Arribas M. V. and Polo M. C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 265–286.
- Murat, M. L., and Dumeau, F. (2003). Impact of fining on population levels of certain spoilage micro-organisms in red wines. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 478, 92–94.
- Oelofse, A., Pretorius, I. S., and Du Toit, M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African Journal of Enology & Viticulture* 29 (2), 128e144.
- O'Donnell, C.P., Tiwari, B.K., Bourke, P., and Cullen, P.J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends Food Science Technology* 21(7):358–367.
- OIV (2009) Office International de la Vigne et du Vin. International code of oenological practices. OIV, Paris.
- Parish, M., Kelly, M., and Baldwin, G. (2003). Managing Brett. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 18, 12–15.
- Peynaud, E., and Domercq, S. (1956). Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et des vins. *Archiv fur Mikrobiologie*, 24, 266–280.

Pizarro F, Vargas FA, and Agosin E. (2007). A systems biology perspective of wine fermentations. *Yeast* 24 (11): 977–991.

Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675–729

Puertola, s E., Lopez, N., Condon, S., Raso, J., and Alvarez, I. (2009). Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal Food Microbiology* 130 (1):49–55.

Puig, A., Vilavella, M., Daoudi, L., Guamis, B., and Minguez, S. (2003). Microbiological and biochemical stabilization of wines by application of high pressure processing. *Bulletin de l'OIV*, 76, 596–617.

Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L. and Cocolin, L. (2012). *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1987–1994.

Rayne, S., and Eggers, N. (2008). 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiacol concentrations in barreled red wines from Okanagan Valley Appellation British Columbia. *American Journal for Enology and Viticulture*, 51(1), 92 e 97.

Renault P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernandez-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A. and Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *International Journal Food Microbiology* 134: 201–210.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology (vol 1). The microbiology of wine and vinification (2nd Edition)*. Wiley, Chichester.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Glories, Y., Maujean, A. (2006). *Handbook of enology (vol 2). The Chemistry of wine: Stabilization and treatments (2nd Edition)*. Wiley, Chichester.

- Riley, M.R., Muzziom, F.J., and Reyes, S.C. (1999). Experimental and modeling studies of diffusion in immobilized cell systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 80: 151–188.
- Rodrigues, N., Goncalves, G., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V., (2001b). Development and use of a differential medium to detect yeasts of the genera *Dekkera*/*Brettanomyces*. *Int. J. Food Micro-biol.* 90, 588–599.
- Rozes, N., Garcia-Jares, C., Larue, F., and Lonvaud-Funel, A. (1992). Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59, 351–357.
- Sancho, T., Jiménez-Jurado, G., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2000). Zymological indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates. *Food Microbiology*, 17, 613–624.
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J.A. and Coimbra, M.A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *The journal European Food Research and Technology* 234: 1-12.
- Scheffers, W. A., and Wikén, T. O. (1969). The Custer effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek. Supplement: Yeast Symposium*, 35, 31–32.
- Schmid, F., Grbin, P., Yap, A., Jiranek, V. (2011). Relative efficacy of high pressure hot water and high power ultrasonics for wine oak barrel sanitization. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 519-26.
- Stender, H., Fiandaca, M., Hyldig-Nielsen, J. J., and Coull, J. (2002). PNA for rapid microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 48, 1–17.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J. J., Sorensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., et al. (2001). Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 938–941.

Suárez-Lepe, J. A. (2001). Microbial spoilage of wine. From Pasteur to the 21st century. *Semana Vitivinicola* 56, 6–16.

Suárez-Lepe, J. A., and Iñigo, B. (2004). El género *Brettanomyces*. In *Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación*: 422–424.

Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., and Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chemistry*, 102(1), 10e21

Suezawa, Y., (1995). Studies of halotolerant yeasts in soy sauce making. Bioconversions of ferulic and p-coumaric acid to volatile phenols by halotolerant yeasts. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 69, 1587–1596.

Ugarte, P., Agosin, E., Bordeu, E., and Villalobos, J. I. (2005). Reduction of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol concentration in red wines using reverse osmosis and adsorption. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 30–36.

Vilela A, Schuller D, Mendes-Faia A, and Côte-Real M (2013). Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology Biotechnology* 97: 4991-5000.

Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Côte-Real, M. (2008). Reduction of volatile acidity of wines by selected yeast strains. *Applied Microbiology Biotechnology* 80: 881–890.


Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R. D., Chaves, S. R., Sousa, M. J and Côte-Real M. (2011). The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology Biotechnology* 89 (2): 271-280.

Wagner, J., and Eng, C. (2001). *Membrane Filtration Handbook – Practical Tips and Hints* (2nd Edition). Osmonics, Inc.

Weinand R. and Dedardel F. (1994). In *Les Acquisitions Récentes dans les Traitements Physiques du Vin* (ed. B. Donèche). Tec. et Doc., Lavoisier, Paris.

Wikén, T. O. (1967). L'influence de l'oxygène sur la fermentation alcoolique par les levures. In 2^e me symposium d'oenologie, INRA, Bordeaux-Cognac, France, 13–17.

6. Anexo 1


AMBERLITE® XAD4
 Industrial Grade Polymeric Adsorbent

André MEIRELES
 93808765

PRODUCT DATA SHEET Fenólica

AMBERLITE XAD4 is a polymeric adsorbent, supplied as white insoluble beads. It is a non ionic crosslinked polymer which derives its adsorptive properties from its patented macroreticular structure (containing both a continuous polymer phase and a continuous pore phase), high surface area, and the aromatic nature of its surface (Figure 1). This structure gives AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent

excellent physical, chemical and thermal stability. AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent can be used through repeated cycles, in column or batch modes, to adsorb hydrophobic molecules from polar solvents or volatile organic compounds from vapor streams. Its characteristic pore size distribution makes AMBERLITE XAD4 an excellent choice for the adsorption of organic substances of relatively low molecular weight.

PROPERTIES

Matrix _____ Physical form _____ Moisture holding capacity ^[1] _____ Shipping weight _____ Specific gravity _____ Particle size _____ Harmonic mean size _____ Uniformity coefficient _____ Fines content ^[1] _____ Coarse beads _____ Maximum reversible swelling _____ Surface area ^[2] _____ Porosity ^[2] _____	Macroreticular crosslinked aromatic polymer White translucent beads 54 to 60 % 680 g/L 1.01 to 1.03 0.49 - 0.69 mm ≤ 2.0 < 0.350 mm : 5.0 % max > 1.18 mm : 5.0 % max. see Table 1 ≥ 750 m ² /g ≥ 0.50 ml/ml
--	--

^[1] Contractual value
^[2] Values based on statistical quality control (SQC)
 Test methods are available on request

SUGGESTED OPERATING CONDITIONS

pH range _____ Maximum temperature limit _____ Minimum bed depth _____ Flow rate _____ Loading _____ Displacement _____ Regeneration _____ Rinse _____	0 - 14 150°C 75 cm 2 to 16 BV*/h 1 to 4 BV/h 1 to 4 BV/h 2 to 16 BV/h
---	---

* BV (Bed Volume) = 1 m³ solution per m³ resin

©2003 Rohm and Haas Company PDS 0556 A - Oct. 03 - 1/4

PROPERTIES (CONTD.)

Figure 1 : Chemical structure of AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent

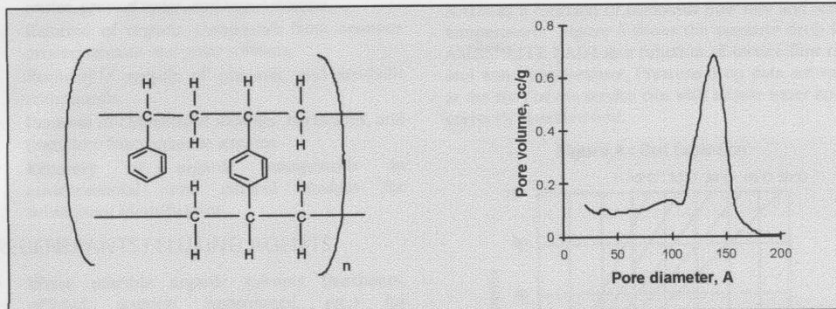


Figure 2 : Pore distribution of AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent

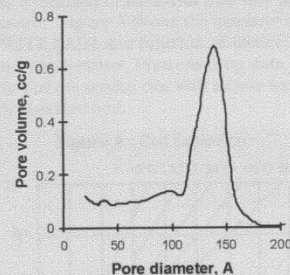


Figure 3 : Infrared Spectrum of Amberlite XAD4 polymeric adsorbent

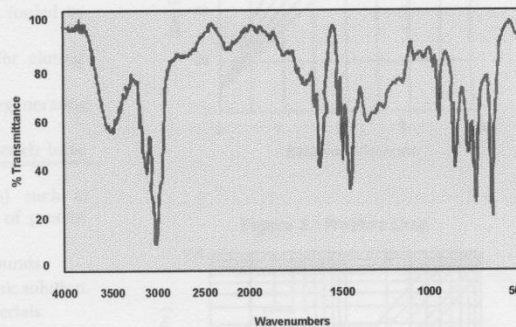


Table 1: Percent swelling of Amberlite XAD4 polymeric adsorbent in various solvents (Water: Solvent)

Solvent	% Increase from as-received volume
Methanol	20
2-propanol	20
Acetone	20
p-Xylene (via methanol)	25

PRETREATMENT

AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent is shipped as a water wet product imbibed with sodium chloride (NaCl) and sodium carbonate (Na₂CO₃) salts to retard bacterial growth. These salts must be washed from the adsorbent prior to use and it is suggested that this be achieved by washing with water at a linear flowrate of 5-10 m/h until the required level is

achieved. In some sensitive applications, residual monomeric or oligomeric compounds may be required to be removed from the adsorbent. A regeneration with the proposed regenerant is also recommended prior to beginning the first service cycle. If the regenerant is an alcohol, it must be displaced with water prior to beginning the first loading cycle.

APPLICATIONS

- Removal of organic pollutants from aqueous wastes, ground water, and vapor streams.
- Removal of organic compounds from aqueous process streams and polar solvents.
- Recovery / recycle of phenolic and aromatic compounds.
- Removal of chlorinated solvents, herbicides, and pesticides from aqueous streams.
- Recovery of organic compounds in environmental and clinical analysis for subsequent identification.

REGENERANTS / ELUTING AGENTS

- Water miscible organic solvents (methanol, ethanol, acetone, isopropanol, etc.) for hydrophobic compounds.
- Pure solvents for regenerating resin fouled by oils and antifoams.
- Dilute bases (0.1 - 0.5% NaOH) for eluting weakly acidic compounds.
- Strong bases (2-4% NaOH) for regenerating resins fouled with proteins, peptides.
- Dilute acids (0.1 - 0.5% HCl) for weakly basic compounds.
- Dilute oxidising agents (< 0.5%) such as peroxide to enhance the removal of protein fouling.
- Buffer elution for pH sensitive compounds
- Water where adsorption is from an ionic solution.
- Hot nitrogen or steam for volatile materials.

FDA CLEARANCE

- AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent has clearance under FDA Food Additive Regulation 21 CFR 173.65 - Divinylbenzene Copolymer. The product may be used for the removal of organic substances from aqueous foods under the prescribed conditions outlined in 21CFR173.65.

HYDRAULIC CHARACTERISTICS

Figure 4 shows the bed expansion of AMBERLITE XAD4 as a function of backwash flow rate and water temperature. Figure 5 shows the pressure drop for AMBERLITE XAD4 as a function of service flow rate and water temperature. Pressure drop data are valid at the start of the service run with a clear water and a correctly classified bed.

Figure 4 : Bed Expansion

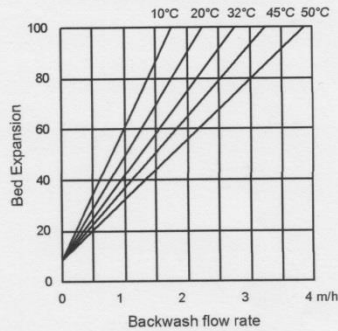
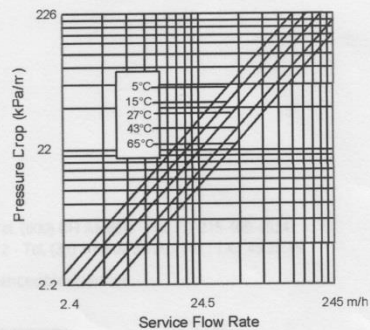


Figure 5 : Pressure Drop



Material Safety Data Sheets

Material Safety Data Sheets (MSDS) are available for all Amberlite polymeric adsorbents. These sheets contain pertinent information that you may need to protect your employees and customers against any known health or safety hazards associated with our products.

We recommend that you obtain copies of our MSDS from your local Rohm and Haas technical representative before using our products in your facilities. We also suggest that you contact your suppliers of other materials recommended for use with our products for appropriate health and safety precautions before using them.

Rohm and Haas/Ion Exchange Resins - Philadelphia, PA - Tel. (800) RH AMBER - Fax: (1)-215-409-4534
Rohm and Haas/Ion Exchange Resins - 75579 Paris Cedex 12 - Tel. (33) 1 40 02 50 00 - Fax : 1 43 45 28 19

WEB SITE: <http://www.advancedbiosciences>



AMBERLITE is a trademark of Rohm and Haas Company, Philadelphia, USA.

Ion exchange resins and polymeric adsorbents, as produced, contain by-products resulting from the manufacturing process. The user must determine the extent to which organic by-products must be removed for any particular use and establish techniques to assure that the appropriate level of purity is achieved for that use. The user must ensure compliance with all prudent safety standards and regulatory requirements governing the application. Except where specifically otherwise stated, Rohm and Haas Company does not recommend its ion exchange resins or polymeric adsorbents, as supplied, as being suitable or appropriately pure for any particular use. Consult your Rohm and Haas technical representative for further information. Acidic and basic regenerant solutions are corrosive and should be handled in a manner that will prevent eye and skin contact. Nitric acid and other strong oxidising agents can cause explosive type reactions when mixed with Ion Exchange resins. Proper design of process equipment to prevent rapid buildup of pressure is necessary if use of an oxidising agent such as nitric acid is contemplated. Before using strong oxidising agents in contact with Ion Exchange Resins, consult sources knowledgeable in the handling of these materials.

Rohm and Haas Company makes no warranties either expressed or implied as to the accuracy or appropriateness of this data and expressly excludes any liability upon Rohm and Haas arising out of its use. We recommend that the prospective users determine for themselves the suitability of Rohm and Haas materials and suggestions for any use prior to their adoption. Suggestions for uses of our products of the inclusion of descriptive material from patents and the citation of specific patents in this publication should not be understood as recommending the use of our products in violation of any patent or as permission or license to use any patents of the Rohm and Haas Company. Material Safety Data Sheets outlining the hazards and handling methods for our products are available on request.

©2003 Rohm and Haas Company

PDS 0556 A - Oct. 03 - 4/4

7. Anexo 2

ROHM HAAS | Ion Exchange Resins

PRODUCT DATA SHEET

Anérica

AMBERLITE™ IRA92 Industrial Grade Weak Base Anion Exchanger

AMBERLITE IRA92 resin is a high capacity polystyrene, weak base anion exchanger. This resin is highly efficient for the uptake of strong acids (e.g. HCl, H₂SO₄) when following a strong acid cation exchanger in the H form. Its macroporous structure

ensures excellent adsorption and desorption of organic matter. It has an outstanding mechanical and osmotic stability, making it suitable for the treatment of solution with high ionic concentrations.

PROPERTIES

Physical form _____	Ivory-coloured spherical beads
Matrix _____	Macroporous polystyrene
Functional group _____	Secondary amine : at least 80 %
Ionic form as shipped _____	Free Base (FB)
Total exchange capacity ^[1] _____	≥ 1.60 eq/L (FB form)
Moisture holding capacity ^[1] _____	40 to 50 % (FB form)
Shipping weight _____	660 g/L
Specific gravity _____	1.035 to 1.065 (FB form)
Particle size _____	
Uniformity coefficient _____	≤ 1.8
Harmonic mean size _____	0.580 to 0.780 mm
< 0.355 mm ^[1] _____	3 % max
Maximum reversible swelling _____	FB → Cl ⁻ : 25 %

[1] Contractual value

Test methods available upon request

SUGGESTED OPERATING CONDITIONS

Maximum operating temperature _____	90°C (FB form)
Service flow rate _____	5 to 30 BV*/h
Regeneration _____	
Regenerants _____	NaOH NH ₃ Na ₂ CO ₃
Level (g/L) _____	40 to 80 40 to 80 60 to 130
Concentration (%) _____	2 to 6 2 to 3 5 to 8
Minimum contact time _____	30 minutes
Slow rinse _____	2 BV at regeneration flow rate
Fast rinse _____	4 to 8 BV at service flow rate

* 1 BV (Bed Volume) = 1 m³ solution per m³ resin

APPLICATIONS

The high total capacity of AMBERLITE IRA92 resin makes it particularly suitable for the removal of strong anions from solutions with relatively high dissolved solids ; its regeneration efficiency is close to the theoretical output. A high operating capacity is obtained from AMBERLITE IRA92 resin under conditions where a high TDS water is treated at a moderate specific flow rate. The combined adsorption efficiency and physical stability of AMBERLITE IRA92 resin make it the product of choice for demineralisation of sugar juices.

On account of its outstanding characteristics AMBERLITE IRA92 resin is used in the following special applications :

- De-acidification of formol,
- Purification of alcaloids,
- Demineralisation of gelatine, lactose, glucose,
- Recovery of chromates from cooling circuits,
- Recycling of rinse water in electroplating workshop.

FOOD PROCESSING

Rohm and Haas manufactures special resins for food processing and drinking water applications. As governmental regulations vary from country to country, it is recommended that potential users contact their Duolite representative to assess the best choice of resin and optimum operating conditions.

All our products are manufactured in ISO 9001 certified facilities.

Rohm and Haas/Ion Exchange Resins - Philadelphia, PA - Te: (800) RH I AMBER - Fax: (215) 409-4534
Rohm and Haas/Ion Exchange Resins - 75579 Paris Cedex 12 - Te: (33) 1 40 02 50 00 - Fax: 1 43 45 28 19

ROHM AND HAAS

ROHM AND HAAS

AMBERLITE is a trademark of Rohm and Haas Company and its affiliates, Philadelphia, USA.
Ion exchange resins and polymeric adsorbents as produced, contain by-products resulting from the manufacturing process. The user must determine the extent to which organic by-products must be removed for any particular use and establish techniques to assure that the appropriate level of purity is achieved for that use. The user must ensure compliance with all prudent safety standards and regulatory requirements governing the application. Except where specifically otherwise stated, Rohm and Haas Company does not recommend its ion exchange resins or polymeric adsorbents as supplied as being suitable or appropriate for any particular use. Consult your Rohm and Haas technical representative for further information. Acidic and basic regenerant solutions are corrosive and should be handled in a manner that will prevent eye and skin contact. Nitric acid and other strong oxidising agents can cause explosive type reactions when mixed with Ion Exchange resins. Proper design of process equipment to prevent rapid buildup of pressure is necessary if use of an oxidising agent such as nitric acid is contemplated. Before using strong oxidising agents in contact with Ion Exchange Resins consult sources knowledgeable in the handling of these materials.

Rohm and Haas Company makes no warranties, either expressed or implied as to the accuracy or appropriateness of these data and expressly excludes any liability upon Rohm and Haas arising out of its use. We recommend that the prospective users determine for themselves the suitability of Rohm and Haas materials and suggestions for any use prior to their adoption. Suggestions for uses of our products or the inclusion of descriptive material from patents and the citation of specific patents in this publication should not be understood as recommending the use of our products in violation of any patent or as permission or license to use any patents of the Rohm and Haas Company and its affiliates. Material Safety Data Sheets outlining the hazards and handling methods for our products are available on request.

© 2008 Rohm and Haas Company | PDS 0316 A | Feb 08 - 2/2

8. Anexo 3



PRODUCT SPECIFICATION

4" XN45 Nanofiltration Element Series

Model	Permeate flow GPD (m3/day)*	Average Salt Rejection (%)	Minimum Salt Rejection (%)
4040- XN45- TSF	2,000 (7.0)	95.00	92.00

Performance is based on the following test conditions: 2,000.0 ppm MgSO₄, 110.0 psi, 25°C, 15% recovery, pH 8.0, 30 minutes operation.

OPERATIONAL AND DESIGN DATA

Membrane Type.....	XN45 Polyamide Advanced Nanofiltration Membrane
Configuration.....	Spiral Wound, Fiberglass Outer Wrap
Active Membrane Area.....	85 ft ² (7.9 m ²)
Recommended Applied Pressure.....	40 - 200 psi (3 - 14 bar)
Maximum Applied Pressure.....	600 psi (41 bar)
Recommended Operating Temperature.....	35 - 113°F (2 - 45°C)
Feedwater pH Range.....	2 - 11 continuous
Tolerance.....	Chlorine Maximum 0.5 ppm nominal, 1.0 ppm max
Feed Flow.....	Minimum 20 GPM (4.5 m ³ /hr)
Brine Flow/Permeate Flow Ratio....	Maximum 5:1
SDI (15 minutes)	Maximum 5.0
Turbidity.....	1 NTU



Element Weight : 15 (7)
 Length (A) : 40.0 (1,016) Diameter (B) : 4.0 (101) Permeate Tube (C) : 0.75 (19.1)
 Units in pounds and inches, units in paranthesis in kilograms and millimetres.

Mechanical Configuration: Filmtec Style Core Tube

Feed Spacer: 0.031" thick diamond spacer

* Permeate flow is clean water flux at standard conditions above. Not applicable for all feedwater conditions. Individual element's permeate flow may vary +/- 15%.



**Engineered Membrane
SOLUTIONS**

9. Anexo 4

Índice de Polifenóis Totais - Resina Fenólica (XAD4)					
	R1	R2	R3	Média	% Retenção
Hora 1	1,0	0,8	1,0	0,9	82%
Hora 2	1,5	1,5	1,8	1,6	70%
Hora 3	1,4	2,0	1,8	1,7	67%
Hora 4	1,4	2,2	1,9	1,8	65%
Hora 5	1,7	2,5	1,8	2,0	63%
Hora 6	3,8	2,5	1,8	2,7	49%

Acidez volátil (g_{ác. Acético}/dm³) - Resina Aniônica (IRA92)					
	R1	R2	R3	Média	% Retenção
Hora 1	0,13	0,09	0,03	0,08	68%
Hora 2	0,12	0,08	0,11	0,10	60%
Hora 3	0,11	0,11	0,12	0,11	56%
Hora 4	0,15	0,12	0,16	0,14	45%
Hora 5	0,15	0,13	0,17	0,15	42%
Hora 6	0,17	0,17	0,19	0,18	32%