



M 2023

DESENVOLVIMENTO DE ROLHAS DE CORTIÇA PARA A GAMA *NO/LOW ALCOHOL SPIRITS*

SOFIA TELINHOS TEIXEIRA RODRIGUES DE CARVALHO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Mestrado em Engenharia Química

Desenvolvimento de Rolhas de cortiça para a gama NO/LOW ALCOHOL SPIRITS

Dissertação de Mestrado

de

Sofia Telinhos Teixeira Rodrigues de Carvalho

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Amorim Top Series SA

AMORIM
TOP SERIES

Orientador na FEUP: Professor Manuel Simões

Doutora Anabela Borges

Doutora Inês Gomes

Coordenador na Amorim Top Series SA: Doutora Sarah Pontes

Agradecimentos

Começaria por agradecer, em especial, na Amorim Top Series à minha orientadora, Doutora Sarah Pontes, à Doutora Ana Henriques e à Engenheira Adriana Oliveira pela total disponibilidade, apoio, interesse demonstrado e confiança depositada em mim ao longo de todo o meu projeto de dissertação. Deste percurso, certamente, fica a aprendizagem e a visão do mundo do trabalho.

Ao Professor Manuel Simões pela constante prontidão para esclarecer qualquer dúvida e pelos conhecimentos transmitidos. Estendo também os meus agradecimentos à Professora Inês Gomes e à Professora Anabela Borges pelo acompanhamento que me deram, sempre de forma incansável, com bastante paciência e dedicação contribuindo para que este percurso se tornasse mais fácil a todos os níveis, desde a realização do trabalho experimental à escrita da dissertação.

A todos os meus amigos, os que me acompanharam durante estes 5 anos e aqueles que estiveram presentes na minha vida, que me ajudaram a crescer e me motivaram tornando este caminho marcante e, seguramente, inesquecível.

Por fim, e não menos importante, agradeço à minha família, em particular, aos meus pais e irmãos pelo incondicional apoio, pelas oportunidades e por tudo o que proporcionaram.

Resumo

Na sociedade atual, a crescente consciencialização da importância de uma vida saudável e dos problemas que a ingestão de álcool pode trazer fez com que o mercado das bebidas espirituosas não alcoólicas fosse cada vez mais procurado. As bebidas espirituosas alcoólicas, devido à grande concentração de etanol presente (até cerca de 40) exibem uma atividade bactericida que permite livrar a bebida de possíveis contaminações. Para esta nova gama de bebidas tal efeito não é verificado. Assim sendo, o foco desta dissertação prende-se com a necessidade de procurar e avaliar diferentes tipos de rolhas - na sua forma microaglomerada de cortiça standard, com a aplicação de tratamentos de superfície na cortiça ou rolha sintética - que sejam capazes de inibir a proliferação de microrganismos, de entre os principais, fungos e bactérias.

Inicialmente, após análise de vários rótulos e da informação presente na literatura, formulou-se uma bebida não alcoólica sintética/simulador tendo por base água engarrafada, açúcar, chá de jasmim e um conservante alimentar (sorbato de potássio, E-202) com o intuito de recriar uma bebida espirituosa não alcoólica real. Posteriormente, avaliaram-se quatro tipos de rolhas diferentes- rolha microaglomerada *standard*, microaglomerada com tratamento UV, compósita e microaglomerada com tratamento com um elastómero de silicone (PWS) - quando em contacto com este simulador. De forma a encontrar um termo de comparação com o simulador, também se colocaram em contacto com as rolhas três bebidas comerciais de gin, água e uma solução etanólica de 12% (v.v⁻¹). Adicionalmente, foram realizados mais três simuladores mantendo os compostos e as suas quantidades, com exceção da concentração do sorbato de potássio que foi alterada no sentido de perceber o efeito que este tem na preservação da qualidade da bebida, nomeadamente, no que diz respeito à carga microbiana. Por fim, foi avaliada a necessidade de adicionar um aditivo antimicrobiano ao tratamento de PWS aplicado na superfície da rolha.

Após um balanço final constatou-se que a rolha microaglomerada *standard* é aquela que exhibe uma maior capacidade de controlar o crescimento de bactérias e fungos enquanto a rolha microaglomerada com tratamento PWS é a menos eficaz neste controlo. Além disso, mostrou-se que a concentração utilizada de conservantes alimentares é capaz de assegurar a durabilidade da qualidade da bebida no que tange à carga microbiana.

Palavras-Chave: rolhas de cortiça; bebida espirituosa sem álcool; bactérias; fungos; conservante alimentar.

Abstract

Nowadays, the importance of having a healthy lifestyle and literacy on the negative effects of drinking alcohol has increased significantly. Thus, people began looking for alternatives, and the non-alcoholic spirits drinks market started to grow. Alcoholic spirit drinks have ethanol in high concentrations (approximately 40%), which enables to avoid contaminations in these drinks since this compound exhibit a bactericidal activity. In this new type of drinks there is no alcohol, the focus of this dissertation holds on the necessity of looking for and evaluating different types of cork stoppers, from their agglomerated standard form to the appliance of superficial treatments, and synthetic stoppers to know whether they can inhibit the microbial (bacteria and fungi) growth.

After the analysis of some labels and through the information gathered from literature, it was possible to develop a non-alcoholic synthetic drink/ simulator based on bottled water, sugar, jasmine tea, and preservatives (potassium sorbate, E-202) where the main objective was to simulate a non-alcoholic spirit drink. Furthermore, four types of stoppers were evaluated - standard agglomerated cork stopper, agglomerated cork stopper treated with ultraviolet light, synthetic cork and agglomerated cork stopper treated with a silicone elastomer (PWS)- when in contact with this simulator. In order to find a comparison term with the simulator, some of the stoppers above were placed in contact with bottled water, three types of real non-alcoholic gin and a solution of 12% ethanol. Additionally, three more simulators were made by using the same components and quantities except from the potassium sorbate concentration that was modified. The purpose was to study the effect that preservatives have in keeping the quality of a drink regarding microbial contamination. At last, it was examined the necessity of adding an antimicrobial additive to the silicone elastomer applied in the surface of the cork stopper.

On the one hand, it was assessed that the standard agglomerated cork stopper had the best performance in controlling the proliferation of fungi and bacteria. On the other hand, the agglomerated cork stopper treated with PWS showed the worst results. Beyond that, it was concluded that the concentration of preservatives in drinks is crucial to guarantee the durability of drinks when talking about their microbial load.

Keywords: Cork stoppers, non-alcoholic spirit drinks; fungi; bacteria; food preservative.

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Porto, 3 de julho de 2023

Sofia Telinhos Teixeira Rodrigues de Carvalho
(Sofia Telinhos Teixeira Rodrigues de Carvalho)

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Apresentação da Empresa.....	2
1.3	Contributos da autora para o trabalho	3
1.4	Organização da Dissertação.....	3
2	Contexto e Estado da Arte	4
2.1	A Cortiça e as suas propriedades	4
2.2	Tipos de Rolhas de Cortiça.....	5
2.3	Microbioma da matriz da cortiça	8
2.4	Bebidas espirituosas alcoólicas e não alcoólicas	8
2.5	Contaminação microbiológica e respetivos tratamentos	11
3	Materiais e Métodos	14
3.1	Preparação dos tipos de rolhas a avaliar.....	14
3.2	Preparação de um simulador não alcoólico/ bebida sintética	15
3.3	Preparação dos ensaios de avaliação microbiana	16
3.4	Ensaio da avaliação da contaminação microbiana	17
3.4.1	Método de espalhamento	19
3.4.2	Método da gota	19
3.4.3	Filtração por vácuo	19
3.5	Aplicação de aditivos ao revestimento da rolha.....	20
3.6	Análise estatística.....	20
3.7	Tabela Resumo	20
4	Resultados e Discussão.....	22
4.1	Bebida não alcoólica sintética com 0,1 g·L ⁻¹ de E-202.....	22
4.1.1	Simulador A	22
4.1.2	Simulador B	23

4.2	Bebida não alcoólica sintética com diferentes concentrações de E-202 (0, 0,3 e 0,6 g·L ⁻¹)	28
4.3	Bebidas de controlo	30
4.3.1	Gin comercial A e B.....	31
4.3.2	Água e solução etanólica de 12% (v·v ⁻¹).....	32
4.3.3	Gin Gordon´s 0,0%	34
4.4	Aditivo antimicrobiano.....	35
5	Conclusões.....	37
6	Avaliação do trabalho realizado	39
6.1	Objetivos Realizados	39
6.2	Limitações e recomendações futuras.....	39
6.3	Apreciação Final	40
7	Referências.....	41
Anexo A - Critérios de identificação de colónias de bactérias e fungos		i
Apêndice A - Cálculos efetuados para preparar o simulador não alcoólico		iii
Apêndice B - Procedimento laboratorial		iv
Apêndice C - Resultados obtidos para o simulador B.....		v
.....		vi
Apêndice D - Cálculo dos resultados obtidos em log (UFC·mL ⁻¹)		vii
Apêndice E - Simulador não alcoólico com uma concentração de E-202 de 0, 0,1, 0,3 e 0,6 g·L ⁻¹		viii
Apêndice F - Bebidas de controlo		xix

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Rolha a) Natural b) Técnica (aglomerados de cortiça) c) Capsulada (PORTFÓLIO.CADA ROLHA TEM UMA HISTÓRIA., 2023).	5
Figura 2.2 - Rótulo de um gin sem álcool a) Gordon´s 0,0% b) Botaniets Original/Ginger e Yuzu.	10
Figura 4.1 - Resultados para o simulador não alcoólico com 0,1 g·L ⁻¹ de E-202 para o PCA sob condições de assepsia.	24
Figura 4.2 - Resultados para o simulador não alcoólico com 0,1 g·L ⁻¹ de E-202 para o PCA na ausência condições de assepsia.	24
Figura 4.3 - Resultados para o simulador não alcoólico com 0,1 g·L ⁻¹ de E-202 para o PDA sob condições de assepsia.	26
Figura 4.4 - Resultados para o simulador não alcoólico com 0,1 g·L ⁻¹ de E-202 para o PDA na ausência de condições de assepsia.	26
Figura 4.5 - Aspeto do simulador C, D e E, respetivamente, após duas semanas de contacto com a rolha.	28
Figura 4.6 - Resultados da contagem de UFC para os simuladores B, C, D e E até às 4 semanas de ensaios para o PCA, respetivamente.	29
Figura 4.7 - Resultados, em número de UFC, para os simuladores B, C, D e E até às 4 semanas de ensaios para o PDA, respetivamente.	30
Figura 4.8 - Resultados obtidos para a bebida A e B, em UFC·mL ⁻¹	31
Figura 4.9 - Resultados obtidos, em UFC·mL ⁻¹ , para a solução etanólica a 12% (v·v ⁻¹).....	33
Figura 4.10 - Resultados obtidos para a bebida Gordon´s 0,0%, pelo método de filtração por vácuo durante 4 semanas.	34
Figura 4.11 - Resultados obtidos para a bebida Gordon´s 0,0% quando em contacto com a rolha 4 com e sem aditivo antimicrobiano.	36
Figura A.0.1 - Critérios de classificação visual /morfologia das colónias de bactérias e fungos (American Society for, 1957).....	i
Figura B.1 - Câmara de fluxo laminar para esterilização UV.....	iv
Figura B.2 - Metodologia utilizada para a preparação do simulador não alcoólico com chá de jasmim a) centrifugação b) após 5 min de centrifugação a 4000 rpm; c) filtração simples com um filtro Whatman número 1; d) filtração por vácuo dentro da câmara de fluxo laminar com um filtro de 0,45 µm; e) filtro após filtração; f) solução final.	iv
Figura C.1 - Resultados após uma semana para a) Placa de PDA versus Placa de PDA com formação de colónias de leveduras b) Placa de PCA versus Placa de PCA com formação de bactérias e fungos.	v

Figura C.2 - Resultados após uma semana para o método de diluição a 10^{-1}v

Figura F.1-Resultados obtidos, para PCA e PDA, após uma semana de análise para água engarrafada. . xx

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 - Classificação das rolhas testadas nos ensaios microbiológicos da rolha.	14
Tabela 3.2 - Especificação dos componentes, das respetivas concentrações e dos controlos para a preparação dos diferentes simuladores não alcoólicos.	16
Tabela 3.3 - Tempo total estimado de análise das bebidas.	18
Tabela 3.4 -Tabela-resumo que sintetiza todas as condições e objetivos dos ensaios efetuados.	21
Tabela E.1 - Resultados, em UFC, para todos os simuladores no ponto de amostragem inicial.	viii
Tabela E.2 - Resultados, em UFC, para todas as rolhas em contacto com o simulador alcoólico com 0,1 g·L ⁻¹ de E-202 por um período de 10 semanas para o meio de PCA na ausência de condições de assepsia.	ix
Tabela E.3 - Resultados, em UFC, para todas as rolhas em contacto com o simulador alcoólico com 0,1 g·L ⁻¹ de E-202 por um período de 10 semanas para o meio de PCA sob condições de assepsia.	xi
Tabela E.4 - Resultados, em UFC, para todas as rolhas em contacto com o simulador alcoólico com 0,1 g·L ⁻¹ de E-202 por um período de 10 semanas para o meio de PDA na ausência das condições de assepsia.	xiii
Tabela E.5 - Resultados, em UFC, para todas as rolhas em contacto com o simulador alcoólico com 0,1 g·L ⁻¹ de E-202 por um período de 10 semanas para o meio de PDA sob condições de assepsia.	xv
Tabela E.6 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico a com 0 g·L ⁻¹ no total das 4 semanas em PDA.	xvii
Tabela E.7 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico a com 0,3 g·L ⁻¹ no total das 4 semanas em PDA.	xvii
Tabela E.8 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico a com 0,6 g·L ⁻¹ no total das 4 semanas em PDA.	xvii
Tabela E.9 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico a com 0 g·L ⁻¹ no total das 4 semanas em PCA.	xviii
Tabela E.10 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico com 0,3 g·L ⁻¹ no total das 4 semanas em PCA.	xviii
Tabela E.11 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico a com 0,6 g·L ⁻¹ no total das 4 semanas em PCA.	xviii
Tabela F.1 - Resultados obtidos, em UFC, para a bebida A ao longo de 10 semanas.	xix
Tabela F.2 -Resultados obtidos, em UFC, para a bebida B ao longo de 10 semanas.	xix
Tabela F.3 - Resultados, em número de UFC, da solução etanólica a 12%.	xx

Tabela F.4 - Resultados obtidos durante 4 semanas para a bebida Gordon's 0,0%, em número de UFC.
..... xxi

Tabela F.5 - Resultados obtidos para a rolha 4 com adição de um antimicrobiano para a bebida
Gordon's 0,0%, em número de UFC. xxi

Notação e Glossário

Lista de Siglas

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
ATS	Amorim Top Series
EVA	Acetato-Vinilo de Etileno
LEBAPE	Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia
PCA	Plate Count Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
PVC	Policloreto de Vinila
ROSA®	<i>Rate of Optimal Steam Application</i>
TCA	2,4,6-Tricloroanisol
TCP	2,4,6-Triclorofenol
UFC	Unidade Formadora de Colónias

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

Como resultado da pandemia Covid-19, a saúde passou a ser vista com mais prioridade e daí surgiu uma maior procura por produtos e bebidas mais saudáveis (Mhalgi & Deshmukh, 2022). As bebidas espirituosas não alcoólicas são produzidas à base de plantas, são consideradas vegan, sem glúten, não alergénicas e apresentam poucas calorias. Para além destas características, também conseguem reproduzir o sabor das bebidas espirituosas alcoólicas tornando-se numa alternativa bastante saudável. Assim, e estando a sociedade cada vez mais consciente dos perigos associados ao álcool, o mercado das bebidas espirituosas com pouco ou nenhum teor de álcool começou a crescer (Mhalgi & Deshmukh, 2022). Bebidas espirituosas derivam da destilação de frutas e grãos que já sofreram fermentação alcoólica. Durante este processo, os microrganismos, sobretudo as leveduras fermentativas, são responsáveis pela produção de etanol e outros compostos (tais como ésteres) contribuindo para a complexidade dos aromas e propriedades sensoriais adquiridas pela bebida destilada. Podem destacar-se as bactérias do ácido láctico e várias espécies de leveduras, sendo a principal a *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, o conjunto de compostos formados durante a fermentação alcoólica, principalmente o etanol, é o maior responsável pela inibição dos compostos presentes nas bebidas alcoólicas bem como o maior responsável por condicionar a sobrevivência dos microrganismos presentes na mesma (Torres-Guardado et al., 2022). A este processo segue-se uma destilação que aumenta a concentração do álcool presente na bebida, pelo que o efeito do etanol é intensificado exibindo uma ação bactericida pois interfere com o transporte dos metabolitos e a formação da parede celular (Cao et al., 2017). Posto isto, a qualidade e segurança alimentar da bebida espirituosa alcoólica é assegurada. Assim, os microrganismos naturalmente presentes na rolha de cortiça não vão ter qualquer efeito. No caso das bebidas espirituosas não alcoólicas, devido à ausência do etanol, não são conhecidos os efeitos e interações que podem resultar do contacto entre a rolha de cortiça capsulada e este tipo de bebidas. Esta problemática é totalmente nova para a indústria das rolhas capsuladas e daí surge a necessidade de avançar com um novo projeto.

Este projeto enquadra-se na unidade curricular Dissertação, do 2^a ano do curso de mestrado em Engenharia Química - especialização em Biotecnologia, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. O tema deste projeto aborda a segurança microbiológica de rolhas capsuladas de cortiça para uma nova gama de produtos de bebidas espirituosas sem ou com teor reduzido de álcool. Em termos específicos, o principal objetivo foi testar diferentes

variáveis (relativamente aos tipos de rolhas e bebidas em contacto com elas) e avaliar o impacto de cada uma delas na contaminação microbiana da bebida.

Esta dissertação foi desenvolvida no Departamento de Engenharia Química - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, em parceria com a empresa Amorim Top Series (ATS). A dissertação desenvolveu-se em diversas etapas experimentais, conforme indicadas abaixo:

- Aplicar vários tratamentos na superfície da cortiça, nomeadamente: exposição a radiação ultravioleta (UV) e o revestimento com elastómero de silicone, denominado de PWS;
- Colocar as rolhas tratadas em contacto com diversas bebidas e verificar o seu efeito no microbioma das bebidas;
- Testar a incorporação de aditivos no tratamento de superfície com PWS, de modo a prevenir a contaminação microbiana da bebida;
- Criar e testar uma bebida espirituosa não alcoólica sintética, com o objetivo de realizar o máximo de ensaios possíveis de forma mais económica.

1.2 Apresentação da Empresa

A Corticeira Amorim, fundada desde 1870, é considerada o maior produtor e fornecedor de rolhas de cortiça a nível mundial. Esta encontra-se dividida em várias unidades de negócio nomeadamente a matéria-prima, as rolhas, os revestimentos, os aglomerados compósitos e os isolamentos.

A ATS é uma unidade de negócio pertencente à Corticeira Amorim que se dedica à produção de rolhas com cápsula para quatro segmentos de mercado distintos, *Prestige*, *Elegance*, *Premium* e *Classic value* capaz de proporcionar um serviço técnico personalizado aos seus clientes. As rolhas capsuladas são utilizadas como vedantes em vinhos fortificados ou bebidas espirituosas- bebidas alcoólicas com elevado teor de álcool. A rolha capsulada pode ser inserida e extraída da garrafa o número de vezes que forem necessárias até a bebida ser totalmente consumida. A ATS faz uso de três tipos distintos de rolha: a rolha natural diretamente retirada da prancha de cortiça, a rolha colmatada que resulta do revestimento, com pó de cortiça e cola, de rolhas naturais de baixa qualidade e, por fim, a rolha *neutrotop* que deriva da aglomeração de microgranulados de cortiça. As cápsulas utilizadas podem ser produzidas em vários materiais (*i.e.*, cristal, metal, madeira), e para além de permitir a inserção e extração da rolha têm uma função estética muito importante (*top series área expert*, 2023).

1.3 Contributos da autora para o trabalho

A autora foi responsável pela total elaboração do trabalho laboratorial, tratamento e análise de resultados e pela escrita do documento, sob supervisão da equipa de orientação.

1.4 Organização da Dissertação

A presente dissertação está dividida em 6 capítulos.

O Capítulo 1 remete para os principais objetivos propostos ao longo da presente dissertação e o enquadramento e motivação da mesma.

No Capítulo 2 é feita uma breve revisão do processo de produção dos diferentes tipos de rolha, a identificação dos microrganismos presentes na cortiça, uma análise dos métodos de produção das bebidas não alcoólicas e ainda, os tratamentos que podem ser utilizados com o intuito de diminuir a contaminação microbiana das rolhas para o seu uso em bebidas não alcoólicas.

O Capítulo 3 descreve os materiais e os métodos utilizados durante este projeto de dissertação. Em concreto, o procedimento laboratorial adotado na preparação de uma bebida não alcoólica sintética, bem como as técnicas utilizadas na avaliação dos microrganismos presentes nas bebidas que estiveram em contacto as rolhas.

No Capítulo 4 apresentam-se os resultados obtidos relativos à quantificação de microrganismos nas bebidas em contacto com as rolhas. As bebidas analisadas durante um período que variou entre 4 a 10 semanas foram: bebida sintética não alcoólica, solução etanólica a 12% (v·v⁻¹), água e três tipos de gin (comercial) não alcoólico.

O Capítulo 5 apresenta as conclusões deste trabalho focando as diferentes bebidas e rolhas estudadas.

O Capítulo 6 fornece uma avaliação sobre o trabalho desenvolvido e apresenta-se sugestões para serem aplicadas num projeto futuro.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 A Cortiça e as suas propriedades

A cortiça é um matéria-prima natural, sustentável e renovável, obtida através da casca do carvalho *Quercus suber L.*, conhecido como sobreiro, que cresce em regiões específicas da zona ocidental do mediterrâneo (Silva et al., 2005). Pode atuar como uma multicamada protetora formada por células mortas que separam as células vivas da planta do ambiente exterior. Dependendo das condições de crescimento de cada região, das dimensões de cada árvore, e da sua idade (quer seja considerada virgem ou reprodutivas), a qualidade e espessura da casca da cortiça podem variar. O período de vida do sobreiro pode variar entre os 170 e os 200 anos, podendo a cortiça ser extraída de 10 em 10 anos quando a casca do sobreiro atinge um diâmetro aproximado de 25 cm. primeira colheita é conhecida como a cortiça virgem e as restantes colheitas como cortiças reprodutivas. É de salientar a importância de Portugal na produção industrial da cortiça, uma vez que é responsável por três quartos desta produção (Mendes, 2002; Silva et al., 2005).

A parede celular da cortiça inclui compostos estruturais e não estruturais. Os compostos estruturais incluem a suberina, a lignina e os polissacarídeos de celulose e hemicelulose, os quais são insolúveis e não podem ser removidos da parede celular sem afetar drasticamente a estrutura celular total da cortiça. A razão de suberina e lignina é altamente relevante para as propriedades da cortiça. A suberina é uma macromolécula de poliéster presente em grandes porções (aproximadamente 50%) que dá propriedades elásticas à cortiça, fazendo com que a sua parede celular possa ser comprimida e dobrada. O polímero reticular aromático encarregue da rigidez estrutural das células e da sua resistência à compressão é a lignina, com uma proporção na cortiça de 22%. Os restantes compostos, que são menos representativos (cerca de 16%) na estrutura da parede celular, ajudam na definição da textura da cortiça (Oliveira & Pereira, 2020).

Os componentes não estruturais podem ser divididos em extrativos - que incluem compostos polares de natureza fenólica e polifenólica e compostos não polares - e em compostos inorgânicos. Os compostos polifenólicos e hidrofóbicos são responsáveis pela cor e pela impermeabilidade da cortiça, respetivamente. Contrariamente ao que acontece com os compostos estruturais, estes podem ser removidos facilmente pela solubilização da parede celular da cortiça sem afetar as suas propriedades essenciais (Leite & Pereira, 2017; Oliveira & Pereira, 2020).

Devido à composição química da cortiça esta é detentora de características incomparáveis, nomeadamente uma baixa densidade e condutividade, muito baixa permeabilidade a líquidos e gases, elevada compressibilidade, estabilidade química, durabilidade, não tóxica e biodegradável. Consequentemente a cortiça pode ser usada para uma variedade de aplicações, incluindo rolhas de cortiça, aglomerados de cortiça para isolamento sonoro/térmico, decoração e outras aplicações gerais (incluindo soluções ainda em desenvolvimento como a produção de carvão ativado e a formulação de produtos farmacêuticos) (Duarte & Bordado, 2015). É de notar que a cortiça de primeira e segunda geração é apenas utilizada para materiais com propósitos decorativos e de construção.

2.2 Tipos de Rolhas de Cortiça

O processo transformativo das rolhas de cortiça pode ser dividido em vários passos: preparação da cortiça; produção e acabamento. Dependendo do tipo de rolhas diferentes tratamentos e passos podem ser aplicados (Oliveira & Pereira, 2020).

A Figura 2.1 ilustra os principais diferentes tipos de rolhas.

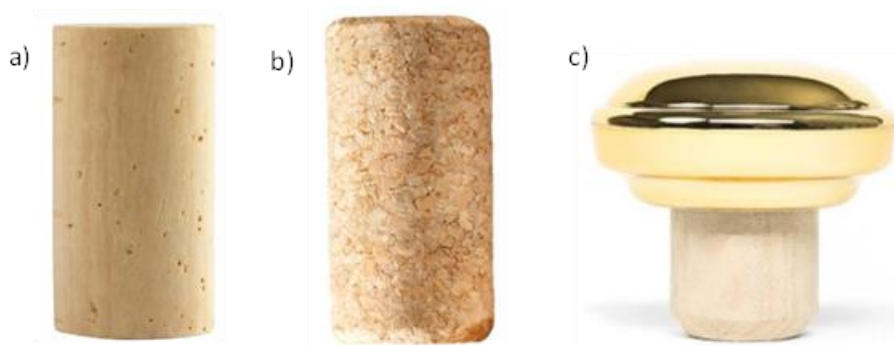


Figura 2.1 - Rolha a) Natural b) Técnica (aglomerados de cortiça) c) Capsulada (PORTFÓLIO.CADA ROLHA TEM UMA HISTÓRIA., 2023).

Primeiramente, a cortiça é extraída e submetida a um período de descanso, de 6 meses, de modo a estabilizar as suas propriedades, nomeadamente o seu teor de humidade. A cortiça é armazenada sob a forma de pilhas, sendo que alguns aspetos devem ser considerados de forma a garantir a manutenção da qualidade da mesma. Assim, estas pilhas são inclinadas de forma a maximizar a circulação do ar, prevenir a contaminação microbiana, e ainda, de forma a evitar o contacto com o solo ou com outras possíveis fontes de contaminação (a madeira, por exemplo, é muito suscetível ao crescimento de fungos). As pilhas de cortiça são submetidas a um tratamento de água fervida em que o principal objetivo é limpar a cortiça através da remoção das substâncias solúveis em água. A cortiça torna-se mais macia, elástica e a sua espessura é aumentada, reduzindo, por sua vez, a sua densidade. Segue-se um período de estabilização/repouso para que a cortiça atinja a consistência necessária, onde esta fica armazenada num

espaço limpo e arejado (European Cork Federation, 2013). Posteriormente é feita uma seleção das placas de cortiça elegíveis (tendo em conta, a espessura, porosidade e aspeto da prancha) para formar rolhas naturais, as quais são cortadas em tiras com uma largura superior ao comprimento das rolhas a fabricar. As placas de cortiça que não foram selecionadas devido à sua baixa qualidade, vão ser utilizadas para produzir rolhas técnicas, discos ou para materiais de construção.

No caso das rolhas naturais, as tiras de cortiça são perfuradas manualmente por um operador ou automaticamente num processo conhecido como processo de perfuração. De seguida, o comprimento, o diâmetro e a ovalidade das rolhas de cortiça são retificados de acordo com os diferentes calibres de rolhas existentes (European Cork Federation, 2013). A lavagem com peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou ácido peracético é realizada com o intuito de limpar e desinfetar a rolha de cortiça. O H_2O_2 altera a superfície da cortiça e pode formar elevadas quantidades de radicais livres capazes de reagir e destruir os compostos indevidos como 2,4,6-tricloroanisol (TCA) presentes na rolha (Recio et al., 2011). É de extrema importância assegurar uma ótima selagem e reduzir ao máximo a contaminação microbiana. Os passos finais incluem a marcação das rolhas com tinta, a fogo ou a laser e o tratamento da superfície das rolhas com parafina ou silicone. Este último tem como objetivo impermeabilizar e facilitar a inserção e remoção da rolha na garrafa (APCOR, 2018). O último processo corresponde à capsulagem onde a rolha de cortiça produzida é colada à cápsula correspondente, formando rolhas capsuladas. Adicionalmente, em casos especiais, o embalamento das rolhas em sacos de plástico é feito com dióxido de enxofre (SO_2), um gás que previne a proliferação microbiológica.

Quando as rolhas naturais apresentam uma menor qualidade do que a esperada devido à elevada porosidade, são colmatadas com cola ou resinas à base de água para que possam ser utilizadas e cumprir a sua função de vedante (European Cork Federation, 2013).

As rolhas de cortiça microaglomeradas resultam de um subproduto da perfuração de rolhas naturais e de produtos de cortiça de qualidade intermédia. Podem ser feitas por moldação individual ou por extrusão. A produção deste tipo de rolhas pode estar dividida na granulação e aglomeração por moldação. De um modo geral, após a obtenção dos granulados, estes são limpos e secos por circulação forçada de ar quente para dar ao granulado o teor de humidade necessário. Posteriormente é efetuado o processo de aglomeração, onde os grânulos com determinado tamanho e densidade são aglutinados através da utilização de resinas de poliuretano, de origem fóssil ou vegetal. Na fase de moldação, os grânulos e as resinas são inseridos em moldes e sujeitos a um tratamento de calor. À *posteriori*, são desenformados e submetidos a um processo de retificação onde são avaliadas a espessura e a textura (APCOR, 2018).

É importante referir que antes do processo de moldação, os granulados usados na produção de rolhas de cortiça microaglomerada são submetidos a um de dois possíveis tratamentos que têm como objetivo reduzir a quantidade de microrganismos e de compostos voláteis presentes nas rolhas. O principal composto identificado é o TCA. A tecnologia ROSA® (*Rate of Optimal Steam Application*) faz uso de vapor de água sob pressão que obriga estes compostos voláteis a saírem da rolha em quase 80% do seu valor total, isto é, para níveis de $1,2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$. Contudo, apresenta algumas desvantagens, em particular, a diminuição do volume de granulado que obriga a inserir uma maior quantidade de matéria-prima e ainda, a sua aplicação ser limitada para baixas concentrações de TCA (Andrii et al., 2022; *Rosa system winning the war against TCA*, 2015).

Para ultrapassar as dificuldades inerentes à tecnologia anterior, desenvolveu-se a tecnologia Xpur®, que consiste numa extração com solvente, o dióxido de carbono (CO_2) supercrítico, isto é, um fluido que se encontra a uma temperatura e pressão mais elevada do que o seu ponto crítico, onde gases e líquidos coexistem. Assim sendo, o CO_2 supercrítico, apresenta uma elevada capacidade de extração de compostos voláteis, uma característica que advém de um líquido e a elevada capacidade de difusão através de determinado material, característica associada a um gás (Andrii et al., 2022; Chaudhary et al., 2021). Este tratamento, pode ser dividido em 3 fases distintas: pressurização, extração e despressurização. É capaz de remover maiores quantidades, assegurando concentrações residuais na cortiça mais baixas, conseguindo níveis de redução de TCA para $0,3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, e assegura que as propriedades mecânicas e físicas da rolha se mantêm (Xpur, 2021). É possível constatar que todos os aglomerados não submetidos a Xpur® são sujeitos ao tratamento ROSA®.

No caso das rolhas naturais, também é efetuado um processo semelhante, mas neste caso o tratamento é aplicado diretamente na rolha antes da fase de lavagem. Uma vez que a rolha pode sofrer deformação ao ser tratada com vapor de água, é utilizado o Super ROSA®, um processo melhorado que deriva do ROSA® (APCOR, 2015). Assim sendo, o Super ROSA® não afeta o teor de humidade e a massa volúmica da rolha de cortiça e utiliza, para além do vapor de água, água e ar como fluidos de extração (Tavares, 2021). Da mesma forma, consegue reduzir os níveis de TCA com bastante eficácia (em 80-85%).

Por fim, as rolhas capsuladas são rolhas - naturais, colmatadas ou microaglomerada - que são coladas a uma cápsula de plástico, madeira, metal ou outro material. O processo de colagem é designado por capsulagem e utiliza colas de termofusíveis ou termoendurecíveis de base EVA (Acetato-Vinilo de Etileno) ou poliuretano. Como já foi referido, as rolhas capsuladas são normalmente utilizadas em bebidas destiladas, licores ou vinhos fortificados tais como vinho do Porto, whisky, vodka (APCOR, 2015).

2.3 Microbioma da matriz da cortiça

A cortiça é um material orgânico natural altamente suscetível à proliferação de microrganismos. O ecossistema microbiano presente na cortiça durante as diferentes etapas do processo de manufatura é especialmente complexo. Outros fatores como a origem da cortiça, as condições de armazenamento e de engarrafamento podem contribuir para esta complexidade. Assim sendo, é difícil determinar concretamente o microbioma da cortiça (Alvarez-Rodríguez et al., 2002).

A quantidade total de microrganismos presente nas rolhas de cortiça é conhecida como a biocarga, em que, bactérias e fungos são os mais identificados (Alvarez-Rodríguez et al., 2002). Assim sendo, algumas das espécies que constituem o microbioma da cortiça são *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. (leveduras), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (bactérias), *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., *Acremonium* spp. e *Aspergillus* spp. (fungos) ("Tecnologia para a eliminação, por radiação gama, dos microorganismos e do TCA nas rolhas de cortiça," 2014; Veloso, 2014). É de se notar que os fungos são os que apresentam uma maior resistência a condições ambientais extremas. A presença deste tipo de microrganismos ou dos metabolitos/compostos por ele produzidos pode afetar diretamente o sabor e as propriedades da bebida (Andrii et al., 2022).

Nos últimos anos, determinados compostos têm sido considerados os responsáveis pelo chamado "sabor a rolha" das rolhas de cortiça, um odor específico por vezes associado ao bolor (mofo e humidade) que afeta a qualidade e as características da bebida, principalmente do vinho. A contaminação destas bebidas é feita por haloanisóis, dos quais se destaca o TCA, cujos precursores são halofenóis, de entre os principais o 2,4,6-triclorofenol (TCP). Estirpes específicas de fungos, nomeadamente dos géneros *Penicillium*, *Fusarium*, e *Trichoderma* são as principais responsáveis por realizar a conversão - através de uma biometilação - do TCP, presente na casca do sobreiro, em TCA. Esta conversão é resultado de um mecanismo de defesa por parte dos fungos filamentosos à presença do TCP, um composto com elevada toxicidade. É importante frisar que, a formação de TCA não está diretamente relacionada com a presença de fungos filamentosos na cortiça, mas sim com a sua contaminação por clorofenóis, nomeadamente TCP (Andrii et al., 2022).

2.4 Bebidas espirituosas alcoólicas e não alcoólicas

Este projeto de dissertação irá focar-se nas bebidas espirituosas não alcoólicas, no entanto, é relevante analisar as principais diferenças existentes entre as bebidas espirituosas alcoólicas e não alcoólicas. De acordo com a *spiritsEUROPE*, um corpo representativo de produtores europeus de bebidas espirituosas, existem três categorias distintas. As bebidas espirituosas

podem ser postuladas como não alcoólicas quando a quantidade de álcool por volume é inferior ou igual a 0,5% (v.v⁻¹), enquanto aquelas consideradas pouco alcoólicas podem atingir um valor de 1,2% (v.v⁻¹). Quando estes valores são superiores a este último, as bebidas são denominadas de alcoólicas (SpiritsEurope, 2022).

Bebidas espirituosas alcoólicas são bebidas destiladas que têm como principal componente o álcool etílico ou etanol, um metabolito primário produzido durante a fermentação de leveduras, um processo que ocorre naturalmente e é responsável por metabolizar carboidratos. No entanto, as bebidas fermentadas só conseguem atingir uma percentagem de álcool entre os 15 - 20 (v.v⁻¹), uma vez que as leveduras fermentativas e as bactérias do ácido láctico não conseguem sobreviver sob altas concentrações de álcool (Shankar et al., 2021) . Desta forma, são realizadas sucessivas destilações com o intuito de aumentar a concentração do álcool. Uma destilação alcoólica baseia-se nos diferentes pontos de ebulição da água e do álcool, 100 °C e 78,5 °C, respetivamente. O álcool está dividido em partes polares e não polares o que o torna capaz de interagir quer com moléculas hidrofílicas como hidrofóbicas. Por esta razão, é altamente eficiente na aquisição de uma variedade de diferentes sabores, uma excelente característica para o processo de produção de bebidas (Thomas & M.Shipman, 2023).

Contudo, há uma tendência crescente no mercado para produzir bebidas espirituosas não alcoólicas que mantenham as características, tais como os sabores únicos e a consistência, das bebidas espirituosas tradicionais. Isto pode dever-se a uma consciencialização gradual da importância de não consumir álcool enquanto se conduz e do possível desenvolvimento de problemas de saúde ou, ainda, a uma necessidade de alternativas às bebidas refrigerantes (Shankar et al., 2021). De acordo com a *NielsenIQ* , uma empresa líder da indústria de tecnologia e análise de dados, em 2022, e em comparação com 2021, o mercado americano relativo às bebidas espirituosas não alcoólicas/com baixo teor de álcool aumentou em 88,4%, o que se traduz em 5,03 milhões de dólares, enquanto o de bebidas espirituosas tradicionais alcoólicas teve um aumento de 0,3% (NielsenIQ, 2022). Estas bebidas sem álcool podem ser produzidas de diversas formas nomeadamente por infusão ou por destilação (*How are non-alcoholic Spirits made ?*, 2022) . A nível mundial espera-se que em 2031 este mercado atinja um valor aproximado de 642,4 milhões de dólares (Mhalgi & Deshmukh, 2022).

A infusão corresponde a uma mímica direta da versão alcoólica em que, durante algum tempo, a água é infundida com aromas essenciais, frutos, plantas aromáticas e especiarias. Dependendo do tipo de bebida espirituosa, podem ser encontrados sabores a maçãs, baunilha, canela, pimenta, coentros, bagas de zimbro, entre outros (*The ultimate guide to non-alcoholic spirits*, 2021).

A destilação contribui para a complexidade aromática da bebida. Existem duas alternativas possíveis, a primeira evita a formação do álcool durante o processo fermentativo onde são feitas sucessivas diluições em água para obter um produto final com uma quantidade inexistente ou muito baixa de álcool. A segunda consiste na remoção do álcool (após destilação) através da destilação fracionada onde o álcool evapora, deixando apenas a essência da bebida espirituosa. Esta última abordagem apesar de ser utilizada mais frequentemente, envolve custos elevados (Torres-Guardado et al., 2022).

Em suma, os ingredientes principais para a formulação de bebidas não alcoólicas são a água, aromas naturais, plantas e frutos com a adição de conservantes alimentares, edulcorantes/açúcar e sal. Os conservantes mais utilizados são o sorbato de potássio (E-202), benzoato de sódio (E-211) e o dicarbonato de metila (E-242) (Petkovic et al., 2009). Na Figura 2.2 encontram-se descritos dois exemplos de um rótulo de um gin comercial sem álcool.

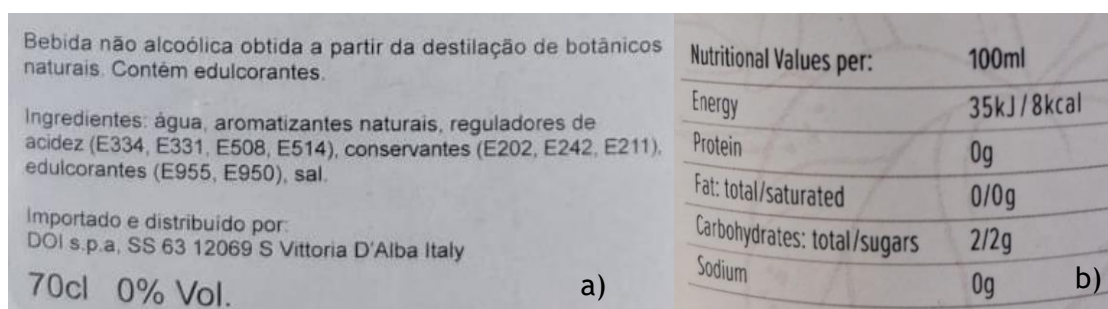


Figura 2.2 - Rótulo de um gin sem álcool a) Gordon's 0,0% b) Botaniets Original/Ginger e Yuzu.

Como mencionado anteriormente, as bebidas espirituosas não alcoólicas podem ser produzidas com recurso à fermentação. Este processo é realizado sob um ambiente controlado dentro das próprias bebidas fermentadas com o intuito de reduzir o crescimento bacteriano e levar ao consumidor um produto seguro e pronto a consumir. No entanto, podem ser detetados alguns microrganismos neste tipo de bebidas tais como bactérias do ácido láctico, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* (Nwaiwu et al., 2020). De acordo com Paramithiotis et al. (2021) quando bebidas fermentadas são contaminadas por *Listeria monocytogenes* e se estiverem em co-cultura com *S. cerevisiae* são capazes de produzir fatores de virulência (como por exemplo, *plcA*, *hly*, *inlA*) que podem afetar a qualidade da bebida e saúde do consumidor. *Bacillus cereus*, *E. coli* e *S. aureus* são outras espécies bacterianas passíveis de contaminar e afetar a qualidade deste tipo de bebidas (Nwaiwu et al., 2020). Por conseguinte, é necessário realizar um controlo de qualidade durante a fase de produção, embalagem, transporte e fornecimento das bebidas não alcoólicas (Hiko & Muktar, 2020).

2.5 Contaminação microbiológica e respetivos tratamentos

Em bebidas espirituosas não alcoólicas a presença de álcool é nula ou praticamente inexistente o que faz com que a bebida não evite a proliferação de microrganismos. Nas bebidas espirituosas tradicionais, o álcool contém uma ação bactericida que inibe a produção de metabolitos essenciais para a rápida proliferação das bactérias (Rutala & Weber, 2016), podendo causar rutura na membrana celular, desnaturar proteínas e consequentemente, afetar a viabilidade celular (Cao et al., 2017). Para concentrações mais elevadas, o etanol mostra-se cada vez mais efetivo devido à sua ação bactericida capaz de provocar a lise celular. Assim sendo, a partir de concentrações na ordem dos 40% esta ação torna-se mais efetiva e segura atingindo o seu ótimo entre os 60 - 85% de etanol (Hamida, 2019; Sauerbrei, 2020). É também importante ter em consideração que determinados tipos de bebidas alcoólicas, nomeadamente gaseificadas, ácidas (com um pH de 2,4 - 3,5) e com uma percentagem de álcool reduzida (inferior a 8,5 (v.v⁻¹)) são suscetíveis a serem contaminadas apenas por determinados tipos de microrganismos (Juvonen et al., 2011).

O crescimento exponencial do mercado de bebidas não alcoólicas levou, assim, à necessidade de estudar diferentes processos que possam ser aplicados na produção de rolhas de cortiça de modo a prevenir a contaminação das bebidas espirituosas não alcoólicas (ou de baixo teor alcoólico). Esta é uma área totalmente nova para a indústria das rolhas capsuladas. Não obstante, na indústria alimentar são conhecidas algumas tecnologias físicas ou químicas para a desinfecção de embalagens e dos próprios produtos. De entre os métodos químicos pode encontrar-se o uso de ozono (O₃), CO₂ a alta pressão e a adição de agentes antimicrobianos. Os métodos físicos compreendem a utilização da radiação ultravioleta (UV), luz pulsada e radiação ionizante (Chiozzi et al., 2022; Rutala & Weber, 2016).

Entre os diferentes métodos mencionados, a utilização da luz UV tem mostrado ser uma boa solução, pois apresenta não apenas propriedades antimicrobianas que permitem manter a segurança microbiológica, mas também assegura a qualidade das superfícies/materiais. As suas aplicações podem incluir a esterilização de equipamentos, do ar e o tratamento de água. Este processo de irradiação UV é responsável por remover as bactérias das superfícies dentro de um espectro eletromagnético com um comprimento de onda (λ), de 200 a 400 nm. Também se mostrou efetivo contra parasitas, fungos e vírus. A luz UV pode ser dividida em UV-A, dos 320 - 400 nm, UV-B, dos 280 aos 320 nm e em UV-C, dos 200 aos 280 nm (Gray, 2014; Yemmireddy et al., 2022). Aquele que se mostrou mais eficaz a destruir as células microbianas, a produzir fotoprodutos do DNA que impedem a transcrição e replicação do DNA e consequentemente, a provocar a morte celular, foi a radiação UV-C, conhecida como UV germicida. Este tipo de radiação germicida apresenta um λ entre os 250 - 260 nm, que também corresponde à eficácia máxima da absorção UV pelo DNA (Kim et al., 2013). Quando a luz UV está fora desta região,

não é considerada uma ação germicida. Contudo, esta eficácia depende da dose utilizada, do tempo de exposição à radiação escolhida e do microrganismo em causa. Para além disso, os tempos de exposição demorados, o baixo poder de penetração na superfície e a utilização de doses não apropriadas constituem algumas desvantagens deste método físico (Gray, 2014; Yemmireddy et al., 2022). É importante realçar que a radiação UV é usada para a desinfeção de alimentos líquidos ou bebidas como leite, sumos, ovos, mel e ainda, para a desinfeção de materiais de contacto alimentar (Koutchma, 2009). Para além disso, frutas e vegetais também são submetidos a esse tratamento (Deng et al., 2020).

A junção de aditivos com ação antimicrobiana aos revestimentos, que são atualmente aplicados nas rolhas, pode constituir uma outra solução preventiva de contaminação das bebidas não alcoólicas. As propriedades mecânicas e a estrutura da rede de elastómeros dependem diretamente do comprimento da cadeia polimérica e da razão dos seus constituintes. No entanto, podem ser enumeradas algumas propriedades comuns a todos os elastómeros de silicone que os faz serem utilizados como revestimento das rolhas de cortiça. Sendo as mais favoráveis, a elevada elasticidade, robustez, biocompatibilidade e o facto de serem quimicamente inertes, o que os permite serem utilizados sob condições mais agressivas (Mazurek et al., 2019).

Aditivos são agentes ativos que exibem propriedades específicas como, por exemplo, antimicrobianas, podendo deste modo ser evitada/reduzida a proliferação de microrganismos da rolha para a bebida. Podem ser incorporados numa determinada superfície, nomeadamente, no revestimento da rolha durante a sua fase de manufatura e assim, a sua migração e libertação é controlada pela espessura do revestimento. Contudo, é preciso garantir que a temperatura do processo não deteriora o aditivo, caso contrário, a sua ação poderá ficar comprometida (Bellotti & Deyá, 2019). Alternativamente, podem interagir diretamente com os microrganismos e evitar que estes proliferem. De entre as várias opções existentes podem destacar-se o uso de iões de zinco e cobre, compostos de organosilano e iões de prata. Estes últimos asseguram o contacto seguro com produtos alimentares, e são capazes de matar bactérias, fungos e determinados vírus sendo impregnados no revestimento da rolha durante a sua fase de manufatura. Os iões de prata são altamente eficazes a baixas concentrações (uma parte por milhão - ppm) e apresentam vários modos de ação (Lansdown, 2006). Pode salientar-se a elevada afinidade para com as proteínas e grupos sulfidríla (S-H) presentes nas membranas celulares microbianas, o que faz com que os iões se liguem à membrana e à parede celular, de forma a bloquearem a entrada e saída de compostos (Khorrami et al., 2018). Também desativam as enzimas envolvidas na respiração celular, fazendo com que a produção de energia (Adenosina Trifosfato - ATP) seja interrompida e com que haja a produção de compostos reativos (Ramkumar et al., 2017). Estes, por sua vez, podem alterar o DNA das células inibindo a sua

replicação ou até mesmo matá-las (Durán et al., 2016). A tecnologia baseada no uso de organosilano baseia-se no uso de um aditivo antimicrobiano com pelo menos uma ligação Carbono-Silício (Ramkumar et al., 2017). Para estes aditivos serem funcionais, o átomo de silício tem de estar ligado a pelo menos dois grupos reativos diferentes para que possam interagir quer com substratos inorgânicos para formar ligações covalentes quer com substratos orgânicos (Gkana et al., 2017). Este aditivo é resistente, capaz de proteger a superfície durante um longo período contra bactérias, fungos e bolores e atua de forma a romper a membrana celular dos microrganismos presentes. É também assegurado o seu uso para superfícies com contacto alimentar (*BIOSAFE Organosilane antimicrobials*, 2023).

3 Materiais e Métodos

Neste capítulo descreve-se a metodologia usada no estudo da contaminação microbiológica de um simulador não alcoólico quando em contacto com diferentes tipos de rolhas de cortiça. Foram preparadas diferentes formulações de simuladores não alcoólicos, em que foi utilizada água engarrafada, chá de jasmim em pó, açúcar e um conservante alimentar para o qual foram testadas diferentes concentrações. Adicionalmente, foi testada uma solução etanólica, água engarrafada e, ainda, diversas bebidas comerciais de gin não alcoólico incluídas na nova gama de produtos *NO/LOW ALCOHOL SPIRITS*. Esta avaliação da contaminação microbiológica, em concreto, de bactérias e fungos, teve uma duração total aproximada de 6 - 10 semanas, dependendo da bebida analisada. A evolução microbiana de cada bebida (diferentes simuladores não alcoólicos, solução etanólica e bebidas comerciais) quando em contacto direto com os diferentes tipos de rolhas foi examinada após a semana inicial e depois de duas em duas semanas.

3.1 Preparação dos tipos de rolhas a avaliar

A avaliação da contaminação microbiológica foi realizada tendo em conta quatro variáveis distintas. De forma a simplificar a avaliação dos resultados e a identificação das rolhas utilizadas efetuou-se a Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Classificação das rolhas testadas nos ensaios microbiológicos da rolha.

Classificação	Tipo de Rolha	Calibre (mm)
Rolha 1	Rolha microaglomerada <i>standard</i>	27 × 19,6
Rolha 2	Rolha microaglomerada esterilizada com radiação UV	27 × 19,7
Rolha 3	Rolha compósita / sintética	28 × 19,5
Rolha 4	Rolha microaglomerada tratada com PWS	27 × 19,7

As rolhas para as bebidas comerciais do fornecedor A são do tipo 1, contudo, com um calibre de 27 × 24 mm. No caso do fornecedor B são usadas rolhas do tipo 1 com o mesmo calibre apresentado na Tabela 3.1. Todas as rolhas foram obtidas e, posteriormente, capsuladas na unidade de produção da ATS, seguindo o seu processo habitual de produção pelo que tiveram exposição prolongada ao ambiente fabril. Cada uma das diferentes rolhas foi capsulada com

uma cápsula de plástico. Após finalização do processo, foram recolhidas e seladas num saco para evitar contaminações externas, para além daquelas a que estão inevitavelmente sujeitas.

Para efetuar a esterilização da rolha com radiação UV utilizou-se uma câmara de fluxo laminar (SterilGard®, The Baker Company, EUA) semelhante à apresentada na Figura B.1 (Apêndice B). Esta incorpora uma lâmpada UV-C capaz de realizar uma descontaminação total da superfície. As rolhas foram colocadas na câmara de fluxo laminar e expostas à radiação UV-C durante um período de 15 minutos.

O tratamento com PWS reforçado, efetuado sobre a rolha 4 tem na sua constituição: um catalisador de platina, um adesivo e um reticulante de silicone. De notar que para a aplicação do mesmo, um tambor de tratamento de rolhas foi utilizado. Os ingredientes necessários para a formulação do elastómero de silicone foram colocados no tambor e de seguida, homogeneizados, a uma velocidade de 80 rotações por minuto (rpm). Na fase seguinte, realizaram-se vários ciclos crescentes de temperatura (até atingir os 90 °C), para a mesma rotação do tambor permitindo a sua reticulação. Seguidamente, procedeu-se à estabilização das rolhas durante o período aproximado de 48 h.

Por fim, procedeu-se à colocação das rolhas nas respetivas garrafas com os respetivos conteúdos. Todo este processo foi efetuado dentro da câmara de fluxo laminar (SterilGard®, The Baker Company, EUA) de modo a proporcionar um ambiente de trabalho estéril (Tantray et al., 2023). Finalmente, as garrafas foram armazenadas horizontalmente de modo a haver um maior contacto entre a bebida e a rolha na ausência de luz a temperatura ambiente.

3.2 Preparação de um simulador não alcoólico/ bebida sintética

Numa fase inicial foram estabelecidas as composições necessárias de cada um dos ingredientes para a preparação deste simulador- chá de jasmim (CHÁ HUNOS, Portugal) ou chá matcha verde (Continente, Portugal) de acordo com o modo de preparação indicado pelos fabricantes, água engarrafada (Penacova, Portugal), açúcar (Continente, Portugal) e sorbato de potássio (Sigma Aldrich, Alemanha). Com esses ingredientes, esperou-se que a solução se aproximasse o mais possível da realidade das bebidas espirituosas não alcoólicas e que garantisse a obtenção de resultados fiáveis. De acordo com a legislação europeia relativa à quantidade de conservantes a adicionar a chás e infusões, nomeadamente de E-202, a quantidade máxima permitida é de 0,6 g·L⁻¹ ou g·kg⁻¹ (Regulation 1333/2008). Posto isto, na Tabela 3.2, encontram-se listadas, as respetivas concentrações de cada componente utilizado e os controlos testados.

Tabela 3.2 - Especificação dos componentes, das respetivas concentrações e dos controlos para a preparação dos diferentes simuladores não alcoólicos.

Composição	Chá de Jasmim em pó (g·L ⁻¹)	Chá matcha verde em pó (g·L ⁻¹)	Açúcar (g·L ⁻¹)	Água engarrafada (L)	Sorbato de Potássio (E-202) (g·L ⁻¹)	Controlo
Simulador						
A	-	5	20	10	0,1	-Solução etanólica 12% (v·v ⁻¹).
B	10	-	20	1,5	0,1	
C	10	-	20	1,5	0,0	- Gin sem álcool
D	10	-	20	1,5	0,3	Gordon's 0,0%.
E	10	-	20	1,5	0,6	-Gin sem álcool fornecedor A e B.

Na preparação de todos os simuladores optou-se por fazer uma solução concentrada em que cada um dos componentes foi pesado, adicionado a um gobelé e o restante volume foi completado com água engarrafada. Com recurso a uma espátula, mexeu-se bem a solução para que esta ficasse homogénea. Adicionalmente, de forma a garantir uma maior homogeneização fez-se uso de um agitador magnético. Posteriormente, efetuaram-se diluições de forma a se obter o volume total necessário. No Apêndice A apresentam-se os cálculos realizados para preparar este simulador.

Após a preparação da solução realizou-se uma centrifugação (10 min, 3220 × g) (Eppendorf centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha) seguida de uma filtração simples com um filtro Whatman número 1 (Whatman, Reino Unido) para que a solução ficasse o mais límpida possível. Posteriormente, seguiu-se uma filtração a vácuo (filtro com poro de 0,45 µm, Whatman, Reino Unido) realizada dentro da câmara de fluxo laminar de modo a esterilizar a bebida antes de a engarrafar em garrafas de vidro com capacidade para 350 mL (previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos). De seguida, as garrafas foram armazenadas na posição invertida. A Figura B.2 (Apêndice B) resume o procedimento imediatamente antes descrito.

3.3 Preparação dos ensaios de avaliação microbiana

Para avaliar a contaminação microbiana foram efetuados dois tipos de ensaios distintos, realizados no LEBAPE. Todos os ensaios preveem que as mesmas rolhas sejam analisadas durante todo o processo, isto é, são retiradas e colocadas nas garrafas, em todos os tempos analisados.

Para os ensaios com o simulador, A e B foram testadas duas condições distintas: a) abertura e o fecho da garrafa para amostragem são feitas em condições de assepsia (usando uma chama

aquando da amostragem para manter o ar circundante estéril); b) ausência de condições de assepsia (abertura e fecho para amostragem sem chama). O facto de ser realizado sob condições de assepsia tem como objetivo prevenir a contaminação externa da rolha e da bebida (Siddiquee, 2017). Para os restantes conteúdos das garrafas (água, solução etanólica de 12% ($v \cdot v^{-1}$), simulador B, C, D e E e as diferentes garrafas de gin sem álcool) a abertura e o fecho da garrafa para amostragem foi sempre efetuado sob condições de assepsia.

Assim sendo, para o caso do simulador A e B, no total dos dois ensaios analisaram-se as quatro variáveis em triplicado, o que fez um total de 24 garrafas. A água, a solução etanólica e o simulador C, D e E foram apenas estudados como forma de referência, em que só foi avaliada uma variável (rolha microaglomerada *standard*), pelo que foram necessárias três garrafas para cada um dos conteúdos a avaliar (15 no total).

Para o caso das bebidas comerciais, utilizou-se gin sem álcool da marca Gordon's. Para este exemplo foram também estudados os quatro tipos de rolhas anteriormente mencionadas, mas apenas sob condições de assepsia. Do mesmo modo, efetuaram-se realizados triplicados pelo que foram necessárias 12 garrafas.

Adicionalmente, foram facultados gin sem álcool comerciais por parte de um fornecedor A e B. O primeiro facultou duas garrafas de um mesmo gin sem álcool com sabor original, isto é, sem qualquer tipo de infusão adicional. Neste caso, o objetivo passou por comparar a rolha sintética atualmente utilizada e comercializada neste produto (isto é, que é utilizada nas garrafas fornecidas) com a rolha microaglomerada *standard* proveniente da ATS. Assim sendo, foi feita uma avaliação microbiana da bebida contida em cada uma das garrafas. O fornecedor B, concedeu uma garrafa de gin sem álcool com sabor original e outra garrafa com o sabor de gengibre e yuzu. Visto que este último facultou duas bebidas com diferentes sabores, utilizou-se o mesmo tipo de rolha (microaglomerada *standard* da ATS) e realizou-se a análise microbiológica dos respetivos conteúdos.

3.4 Ensaios da avaliação da contaminação microbiana

A avaliação microbiológica do líquido contido nas garrafas incluiu uma análise tanto aos fungos como às bactérias e por isso, foram selecionados dois meios de cultura diferentes. As bactérias foram analisadas com o intuito de quantificar as unidades formadoras de colónias (UFC). No caso dos fungos, dependendo das colónias observadas foi feita a sua quantificação, quando possível. Para uma melhor compreensão do tipo de colónias existentes tanto em bactérias e fungos, apresenta-se na Figura A.1 no Anexo A as possíveis morfologias. Se forem pequenas colónias circulares é possível fazer a contagem de UFC.

Para fazer a análise do crescimento das bactérias, utilizou-se o meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA)(Sagen, 2023), preparado de acordo com as indicações do fornecedor (VWR, Bélgica).

O crescimento dos fungos foi analisado com recurso ao meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Rodríguez-Andrade et al., 2020), preparado de acordo com as indicações do fabricante (Merck, Portugal).

Ambos os meios de cultura foram esterilizados a uma temperatura de 121 °C e uma pressão de 1,2 bar, numa autoclave, por um período de 20 minutos. Após esterilização, foram dispersos em placas de Petri (em condições de assepsia), de forma a solidificar para posterior utilização.

Para além da preparação destes meios de cultura, também foi necessário preparar uma solução salina com 8,5 g·L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) em água destilada.

Salienta-se ainda que, para além dos meios de cultura, todos os restantes materiais utilizados foram devidamente esterilizados numa autoclave sob as mesmas condições anteriormente mencionadas. Desta forma, garante-se a eliminação de qualquer microrganismo, incluindo aqueles que são resistentes a temperaturas elevadas - organismos termófilos.

Ao fim do tempo estipulado, foi feita a abertura das garrafas e a análise da contaminação microbiológica do líquido. A Tabela 3.3 indica o tempo total de avaliação de cada uma das bebidas.

Tabela 3.3 - Tempo total estimado de análise das bebidas.

Bebida a analisar	Tempo estimado de análise (semanas)
Simulador A	1
Simulador B	10
Simulador C/D/E	4
Gin sem álcool-fornecedor A	10
Gin sem álcool-fornecedor B	10
Gin sem álcool- Gordon´s 0,0%	4
Solução etanólica 12% (v·v ⁻¹)	10

Inicialmente, foram utilizados três métodos distintos (método do espalhamento, método da gota escorrida e filtração por vácuo) de forma a perceber qual deles se adequaria à carga microbiológica das amostras a estudar. Todos eles foram efetuados sob condições de assepsia

de forma a garantir a esterilidade e a obtenção de resultados fidedignos sem contaminações. Após a realização de cada um dos métodos escolhidos, os meios de cultura foram incubados numa estufa a 25 °C durante, aproximadamente, 48h (Pietikäinen et al., 2005). Ao fim do tempo indicado, contaram-se as UFC de bactérias, identificou-se a presença ou não de fungos e fez-se, possivelmente, a sua quantificação. É de evidenciar que o método de contagem é aproximado tanto para bactérias como para fungos.

3.4.1 Método de espalhamento

A avaliação da quantidade de microrganismos observados na água engarrafada foi efetuada tendo por base o método de espalhamento (diluição 0). O simulador E faz, igualmente, uso deste método. Este consiste em espalhar 500 µl do líquido contido nas garrafas em ambos os meios de cultura previamente secos numa placa de Petri com recurso a espalhadores de plástico estéreis. Subsequentemente, o meio absorve o inóculo. É importante referir que este método é limitado a uma amostra de 100-500 µl, pelo que o seu uso limita a sua aplicação para amostras com poucas ou demasiadas quantidades de colónias de bactérias (Boczek et al., 2014).

3.4.2 Método da gota

Para a amostragem do simulador B, C, D e E foram efetuados os métodos de contagem de unidades formadoras de colónias. Para a abertura e fecho das garrafas realizado sob e sem condições de assepsia utilizou-se o método da gota com um fator de diluição de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , em alguns casos.

O procedimento adotado consiste na adição de 500 µl do líquido a avaliar num tubo de falcon (VWR, Portugal) já com 4,5 mL de salina. Posteriormente, colocam-se 2 gotas de 10 µl desta solução diluída em ambos os meios e vira-se ligeiramente a placa, já fechada, de forma que as gotas percorram a placa de Petri, sem tocar nas extremidades. Para prosseguir com as diluições seriadas, retiram-se 500 µl da solução do fator de diluição anterior ao pretendido e acrescentam-se, igualmente, a 4,5 mL de salina (Jett et al., 1997).

3.4.3 Filtração por vácuo

No caso das bebidas comerciais A, B e da marca Gordon's optou-se por utilizar o método da filtração por vácuo. Assim sendo, é montado o sistema de filtração por vácuo, em que são filtrados 13,5 mL do conteúdo das garrafas. Cada filtro com 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemanha) é usado estéril. Após filtração, o filtro é colocado nas placas com o meio de PCA (Mulvany, 1969).

3.5 Aplicação de aditivos ao revestimento da rolha

Nesta etapa testou-se a incorporação de um aditivo, que tem por base uma tecnologia de iões de prata, durante a aplicação de PWS nas rolhas. Importante mencionar que este aditivo foi facultado por parte de um fornecedor C.

Aquando da preparação do revestimento de PWS acrescentou-se uma quantidade de aditivo microbiano que corresponde a 0,4% do conteúdo total de sólidos da camada superficial formada na rolha. Assim sendo, examinou-se o desempenho do aditivo em relação à proliferação dos microrganismos e a sua compatibilidade para com o revestimento.

Após aplicação do aditivo, as rolhas foram inseridas nas garrafas que contêm gin sem álcool Gordon's. Utilizaram-se três garrafas. Seguindo o mesmo procedimento, para a avaliação da contaminação microbiana, utilizou-se o método de filtração por vácuo, e procedeu-se a uma avaliação após a primeira e segunda semana de contacto entre a rolha e a bebida.

3.6 Análise estatística

Em alguns dos casos analisados, nomeadamente nos simuladores B, C, D e E, recorreu-se à análise ANOVA (Análise de variância) do Excel para realizar uma avaliação estatística baseada no valor-p (P) com um nível de significância de 5%. Esta tem como objetivo comparar os diferentes simuladores e as respetivas condições no que diz respeito à quantidade microbiana identificada em cada um deles. Assim sendo, se $P > 0,05$ então não há diferenças estatisticamente significativas. Pelo contrário, quando se obtém um $P < 0,05$, essas diferenças são significativas (Smalheiser, 2017).

3.7 Tabela Resumo

Na Tabela 3.4 é sintetizada a informação relativa a todos os ensaios efetuados, nomeadamente, em relação o tipo de bebida, as rolhas, o tempo de análise e o objetivo de cada um dos ensaios.

Tabela 3.4 -Tabela-resumo que sintetiza todas as condições e objetivos dos ensaios efetuados.

Bebidas	Objetivo	Rolha /variável	Tempo (semana)
Simulador A	Avaliar a quantidade de bactérias e fungos utilizando um <u>simulante</u> de uma bebida espirituosa não alcoólica para que seja realizado o maior número de ensaios possível e concluir acerca da rolha que mostra um melhor desempenho.	Microaglomerada <i>Standard</i>	1
Simulador B		Microaglomerada com radiação UV	
		Compósita /sintética	10
		Microaglomerada com tratamento PWS	
Simulador C /D/E	Estudar o efeito que a concentração de um conservante alimentar (E-202, neste caso) pode ter na conservação e qualidade da bebida.	Microaglomerada <i>Standard</i>	4
		Microaglomerada <i>Standard</i>	10
		Sintética do fornecedor A	
Bebida real A	Servem de controlo para comparar os resultados de bebidas espirituosas vendidas no mercado com o simulador e validar os resultados obtidos.	Microaglomerada <i>Standard</i>	10
Bebida real B			
Bebida Gordon's 0,0%		Microaglomerada <i>Standard</i>	4
		Microaglomerada com radiação UV	
Água engarrafada	Servem de controlo para verificar o impacto da água (sem nenhuma adição) e que esta concentração de álcool é a suficiente para inibir o crescimento de microrganismos.	Compósita /sintética	2
		Microaglomerada com tratamento PWS e tratamento PWS + aditivo	1
Solução etanólica a 12 % (v·v ⁻¹)		Microaglomerada <i>Standard</i>	10

4 Resultados e Discussão

De acordo com Hiko and Muktar (2020), para diferentes tipos de bebidas como água engarrafada, bebidas energéticas e sumos e fazendo uso de vários métodos de entre os quais se destaca o método de contagem total de microrganismos, os valores relativos à contaminação microbiana podem variar entre $3,42 - 3,71 \log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$. Por sua vez, não tendo qualquer referência para bebidas espirituosas sem álcool e considerando que um sumo tem características equiparáveis à bebida não alcoólica sintética criada assume-se o valor de $3,71 \pm 0,38 \log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$, e, conseqüentemente, um intervalo de referência de $3,33 - 4,09 \log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$, isto é, $2137 - 12302 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$.

4.1 Bebida não alcoólica sintética com $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de E-202

4.1.1 Simulador A

A bebida sintética tinha na sua formulação chá matcha verde - simulador A. Os restantes compostos estão descritos na Tabela 3.2. Para avaliação da carga microbiana foram utilizados vários métodos: método de espalhamento, método da gota (fator de diluição 10^{-1}) e filtração por vácuo. O meio de cultura PCA foi utilizado para os três métodos enquanto o PDA apenas para o primeiro e segundo.

Após a primeira semana de contacto das rolhas com o simulador A (com chá verde matcha), verificou-se para ambos os meios de cultura, uma elevada quantidade de colónias presentes em todas as placas analisadas. Isto é, para os ensaios em que a abertura da rolha é feita ou não em condições de assepsia. Para o caso do método de espalhamento, como o número de colónias ultrapassa as 300 em todas as placas, não é viável utilizar estes resultados uma vez que não nos permitem tirar qualquer conclusão, nomeadamente, em relação ao tipo de rolha que melhor se adequa para prevenir a contaminação de microrganismos. Similarmente ao observado anteriormente, há uma grande proliferação de microrganismos quer para o método da gota como para a filtração por vácuo. De notar que, devido à cor do simulador (verde-escuro por causa do chá utilizado) e a uma espessa camada de pó retida na membrana é difícil identificar e distinguir as diferentes colónias, ainda que seja possível visualizar alguns pontos amarelados à volta do líquido filtrado (indicadores de que houve o crescimento microbiano). No Apêndice C são apresentados os resultados após 1 semana para este simulador.

De uma forma geral, a elevada proliferação de bactérias e fungos é coerente para todos os métodos executados. Tal observação poderá dever-se às concentrações de cada componente utilizado para a preparação do simulador, nomeadamente de sorbato de potássio ou ao tipo de chá escolhido. Por conseguinte, e não sendo possível tirar qualquer conclusão a partir dos

ensaios já efetuados, propôs-se começar de novo os ensaios, realizando algumas alterações ao modo de preparação do simulador para evitar que problemas idênticos se repitam. Estas passam pela alteração do tipo de chá a utilizar - um chá mais translúcido como o chá de jasmim - e pela implementação da centrifugação seguida da filtração da bebida antes de se proceder ao seu engarrafamento, com o intuito de remover grande parte dos sólidos suspensos e garantir a esterilização da bebida - simulador B. Na Figura B.2 no Apêndice B mostra-se o aspeto final do novo simulador não alcoólico preparado.

4.1.2 Simulador B

Primeiramente, determinou-se a quantidade de microrganismos inicial, identificados logo após a preparação da bebida. No ponto inicial, não houve praticamente crescimento de bactérias nem fungos. Para uma avaliação mais acertada dos resultados, preferiu-se utilizar o método da gota com um fator de diluição de 10^{-1} , 10^{-2} ou 10^{-3} , dependendo das UFC obtidas. De salientar que as diluições são efetuadas para que o número de células por amostra seja reduzido e deste modo, seja viável realizar a contagem de UFC (Boczek et al., 2014). A escolha da diluição teve em consideração que as placas entre 10-100 UFC são aquelas que se encontram dentro do limite de deteção do método. No entanto, quando este critério não é observável em nenhuma das diluições efetuadas, são também contadas aquelas com valor inferior a 10, incluindo quando não há o aparecimento de colónias. Neste último caso, o desvio padrão fica mais acentuado pois a média de valores apresenta elevada variabilidade e por conseguinte, associa-se uma menor credibilidade ao valor obtido (Schillaci & Schillaci, 2022).

A Figura 4.1 mostra a quantidade de bactérias e fungos passíveis de se contabilizar, no meio de PCA, quantificado na presença das condições de assepsia, respetivamente, sob a forma de $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$ para as diferentes rolhas avaliadas em função do tempo do estudo. O cálculo destes resultados teve por base a equação presente no Apêndice D. O principal objetivo destes ensaios é avaliar o impacto que cada tipo de rolha (Rolha 1 -microaglomerada standard, Rolha 2 - microaglomerada com esterilização UV, Rolha 3 - compósita/sintética e Rolha 4 - microaglomerada com tratamento PWS) apresenta na proliferação de microrganismos na bebida. Aferiu-se ainda a diferença de comportamento em bebidas cuja abertura é feita num ambiente estéril ou num ambiente menos controlado.

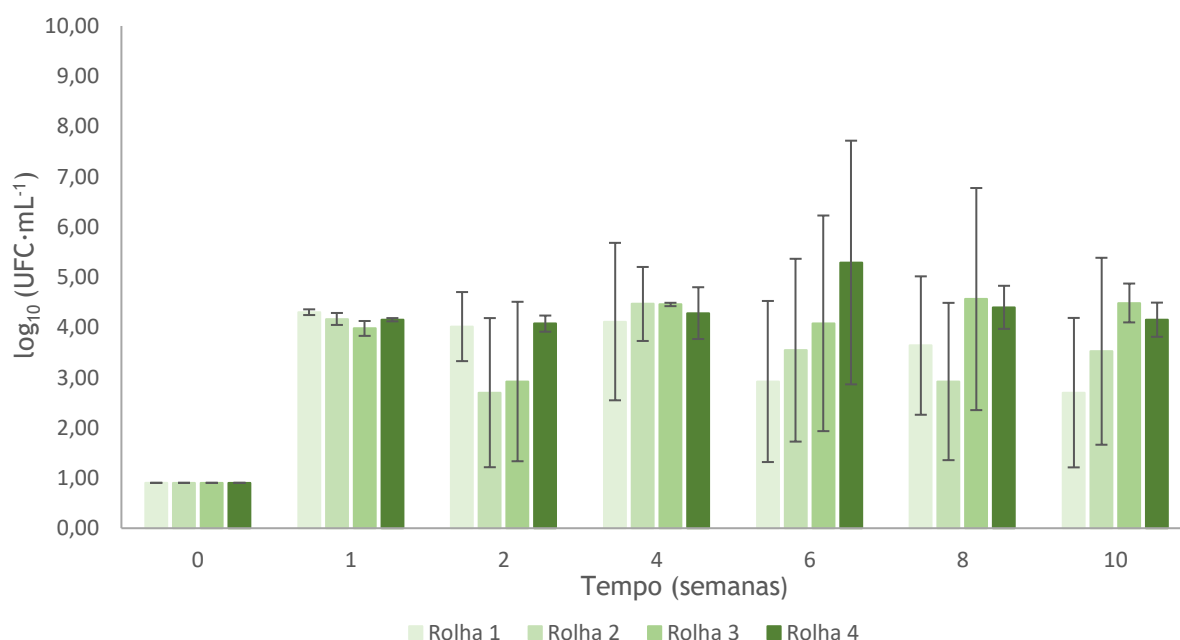


Figura 4.1 - Resultados para o simulador não alcoólico com $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de E-202 para o PCA sob condições de assepsia.

Na Figura 4.2 é mostrada a quantidade de bactérias e fungos contabilizados na ausência de condições de assepsia no meio PCA.

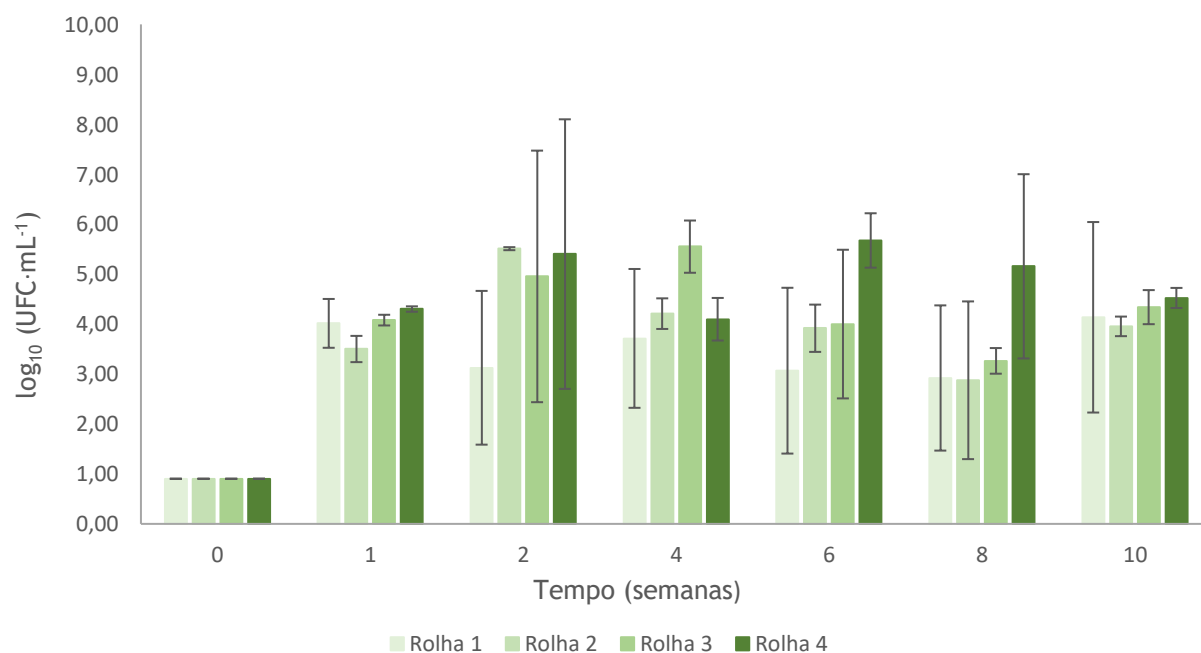


Figura 4.2 - Resultados para o simulador não alcoólico com $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de E-202 para o PCA na ausência condições de assepsia.

Através da comparação das Figuras anteriores é possível observar um ligeiro aumento em relação ao número de colónias contadas quando a rolha fica exposta ao ar livre, isto é, a

abertura e o fecho das garrafas não são feitos sob condições de assepsia. Todavia, esta é uma diferença que não é significativa ($P > 0,05$). Esperava-se que esta se mostrasse considerável pois, no segundo caso, não há controlo sobre o meio envolvente da rolha e das interações que possam daí surgir.

Em ambos os cenários, verifica-se que a rolha 1 é aquela que sofre menos oscilações ao longo das 10 semanas, permanecendo sempre numa gama de valores, 2,70 - 4,30 e 2,92 - 4,14 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$, mais próximas do intervalo de referência considerado (3,33 - 4,09 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$). Contrariamente, a rolha 4 é aquela que, em geral, apresenta sempre um valor mais alto das restantes e afastado da referência, entre 4,07 - 5,29 e 4,10 - 5,67 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$. Em relação à rolha 2 e 3, estas aparentam ter um comportamento semelhante, onde se verifica uma maior flutuação dos resultados. Para a rolha 2 os resultados encontram-se entre 2,70 - 4,46 e 2,88 - 5,51 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$, na rolha 3 têm-se intervalos de valores entre 2,92 - 4,56 e 3,26 - 5,55 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$.

É importante realçar que muitas das barras observadas têm a elas associada um elevado desvio padrão, o que se torna num inconveniente e retira fiabilidade ao conjunto de resultados obtidos. Para além disso, como muitos dos resultados apresentam algumas oscilações de semana para semana, isto é, numa semana os valores sobem e na seguinte já descem, é difícil efetuar uma análise dos resultados que garanta a sua validade. Na Tabela E.2 e E.3 (Apêndice E), apresentam-se o número de UFC obtidas para estes casos.

De salientar que as UFC formadas no meio de PCA são indicadoras da carga microbiana global, isto é, podem ser relativas tanto a bactérias como a fungos.

No caso do PDA, visto que a maioria das colónias eram circulares foi possível realizar a sua contagem. O facto de apresentarem este aspeto é indicativo de que são leveduras ou bactérias, pois, o PDA, também permite o crescimento de bactérias. Por vezes, também se verifica o crescimento de colónias que aparentam ter ramificações associado à presença de fungos (Cole, 1996). O número de UFC contabilizadas no PDA em função do tempo de análise e da realização dos ensaios sob condições de assepsia está apresentado na Figura 4.3.

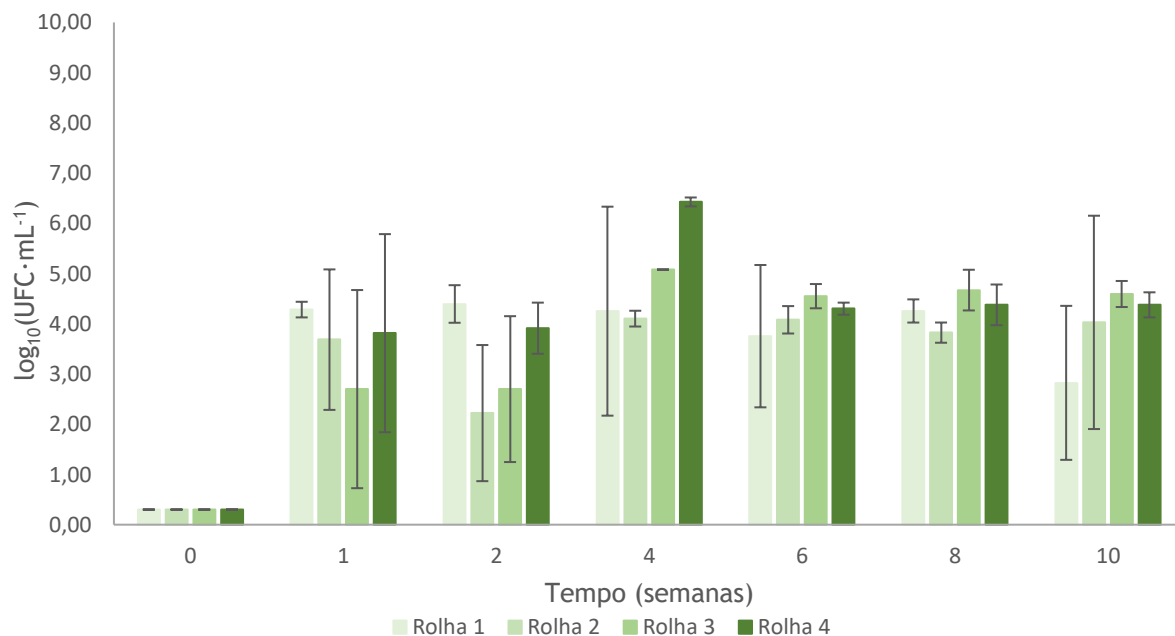


Figura 4.3 - Resultados para o simulador não alcoólico com $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de E-202 para o PDA sob condições de assepsia.

A Figura 4.4 representa o número de UFC contabilizados em função do tempo na ausência de condições de assepsia, no meio de cultura de PDA.

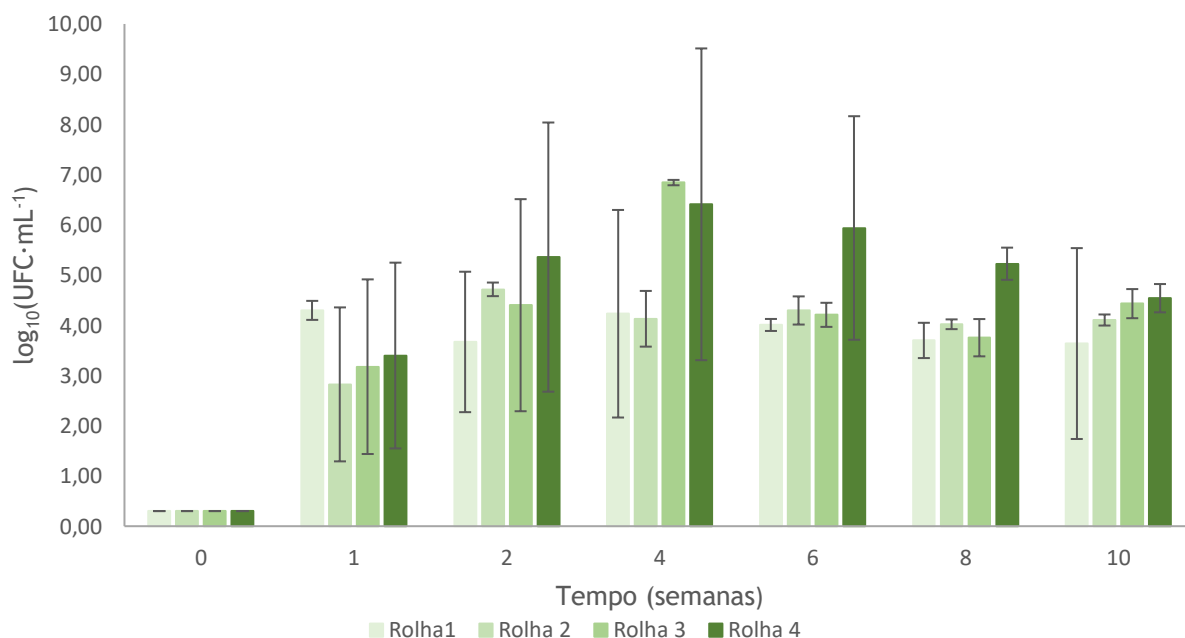


Figura 4.4 - Resultados para o simulador não alcoólico com $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de E-202 para o PDA na ausência de condições de assepsia.

É possível deduzir que tal como, no meio do PCA, a diferença existente na contagem dos microrganismos quando as rolhas são retiradas e colocadas novamente perante condições de assepsia não é relevante ($P > 0,05$).

De um modo geral, a tendência verificada no PCA é aqui repetida. Por outras palavras, a rolha 4 é aquela que apresenta um número mais elevado de fungos e leveduras (e possivelmente de bactérias), ainda que, nem sempre de forma crescente ao longo de todas as semanas inserindo-se numa gama de valores entre 3,40 - 6,43 e 3,81 - 6,41 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$. Este intervalo de valores é mais extenso e distante da referência - 3,33 - 4,09 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$. De entre os restantes tipos de rolhas, a rolha 1 e 2 são capazes de manter o comportamento durante o tempo total de análise. Estas assumem valores entre 2,82 - 4,39 e 3,67 - 4,30 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$ para a rolha 1 e entre 2,22 - 4,10 e 2,82 - 4,72 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$ na rolha 2, ambos bastante próximos da referência considerada. A rolha 3, com exceção da semana 4, também se comporta de modo semelhante. As gamas de valores relativa a esta última são 2,70- 5,08 e 3,18-6,84 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$ sendo que os valores mais altos correspondem à semana 4. Assim, associa-se à semana 4, uma possível contaminação aquando da amostragem pois aqui é visualizado um aumento acentuado que depois decresce.

Como no caso anterior, do PCA, existem muitos ensaios que demonstram ter um grande desvio padrão e pelo mesmo motivo, isto tira robustez às conclusões tiradas. O número de UFC obtidas para estes casos encontram-se em Apêndice E, nas Tabelas E.4 e E.5.

Através da comparação dos resultados obtidos entre o PCA e o PDA, infere-se que a quantidade de microrganismos detetados em cada um dos métodos se aproxima ($P > 0,05$) não sendo possível afirmar qual é o tipo de microrganismos, bactérias ou fungos, que mais está presente nas bebidas. Isto deve-se ao facto do PCA favorecer o crescimento de bactérias, mas permitir a proliferação de fungos e o mesmo acontece com o PDA, ou seja, que promove o crescimento de fungos e leveduras, mas não inibe a presença de bactérias.

De acordo com os tratamentos aplicados nas rolhas e com os próprios tipos de rolhas esperar-se-iam outros resultados (tanto no PCA como no PDA). A rolha 1, 2 e 4 são do mesmo tipo, diferindo no facto da segunda ter sido submetida a radiação UV e a quarta a um tratamento de superfície de PWS. A radiação UV é considerada uma forma de desinfecção aplicada em diversas áreas e presumia-se que por este motivo, fosse apresentar resultados melhores e uma diferença significativa pelo menos quando comparada com a rolha 1. No caso da rolha 4, como esta tem um tratamento aplicado em toda a sua superfície colocou-se a possibilidade de também evidenciar valores mais promissores do que a rolha 1 já que este pudesse ser visto como uma camada de proteção entre a microbiota da cortiça e a bebida. A rolha 3 apresenta grandes variações e valores elevados. Segundo Cappitelli and Sorlini (2008), os microrganismos são capazes de danificar a estrutura e afetar a função de polímeros sintéticos através de vários mecanismos dos quais se pode destacar a degradação enzimática e produção de metabolitos (por exemplo, ácidos). Esta poderá ser uma possível justificação para os resultados observados.

Assim, conclui-se que a rolha 1, pelas razões identificadas anteriormente, parece ser a melhor escolha para o uso com bebidas espirituosas não alcoólicas.

Por fim, a quantidade de microrganismos, em PCA e PDA, presentes no simulador enquadra-se num intervalo de valores entre 2,70 - 5,81 e 2,22 - 6,84 $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$, respetivamente. Visto que o conjunto dos valores apresentados exibe uma elevada variabilidade e traduz um elevado número de UFC observadas em comparação com o intervalo de referência considerado, tentou-se arranjar uma alternativa que permitisse obter uma maior uniformidade dos mesmos e uma menor contaminação microbiana. De salientar que a variação presente nos resultados da rolha 4 pode ser explicada pelo facto do tambor rotativo não conseguir garantir a total homogeneidade do tratamento de PWS pelas rolhas. A solução encontrada passa por fazer mais simuladores, mas com diferentes concentrações de E-202 a serem estudadas.

4.2 Bebida não alcoólica sintética com diferentes concentrações de E-202 (0, 0,3 e 0,6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

Com o propósito de tentar perceber qual a melhor composição do sorbato de potássio a utilizar e atingir melhores resultados, foram preparados mais 3 simuladores com chá de jasmim em que o componente variável é o sorbato de potássio- simulador C, D e E. A rolha 1 é usada para todas as garrafas. Como visto anteriormente, a quantidade máxima permitida por lei para a adição deste conservante a infusões é de 0,6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Assim sendo, optou-se por utilizar concentrações de E-202 de 0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (simulador C), 0,3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (simulador D) e 0,6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (simulador E) para que fosse possível inferir a eficácia do uso de conservantes nas bebidas e o seu impacto no crescimento microbiano. A preparação destes simuladores é efetuada exatamente da mesma forma. Esta avaliação teve a duração de 4 semanas.

A Figura 4.5 mostra a aparência e a cor do simulador não alcoólico com as rolhas, após duas semanas de armazenamento.



Figura 4.5 - Aspeto do simulador C, D e E, respetivamente, após duas semanas de contacto com a rolha.

De notar que com o aumento da concentração de E-202, a cor do simulador apresenta um laranja mais escuro e próximo do tom inicialmente observado. De outra forma, para uma concentração nula de E-202 o simulador aparenta ser mais turvo/ baço e à medida que concentração do conservante aumenta, até aos $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a solução torna-se visivelmente mais límpida. Isto comprova que efetivamente, para um curto espaço de tempo (2 semanas de contacto entre a rolha e o simulador) a quantidade de conservante alimentar utilizado tem um impacto positivo na conservação da bebida.

Após contagem do número de UFC para cada simulador, representam-se os resultados na Figura 4.6, relativos ao número de UFC em função do tempo total de análise correspondente para o meio de PCA. De salientar que se incluíram aqui os resultados obtidos anteriormente com o simulador B até perfazerem 4 semanas.

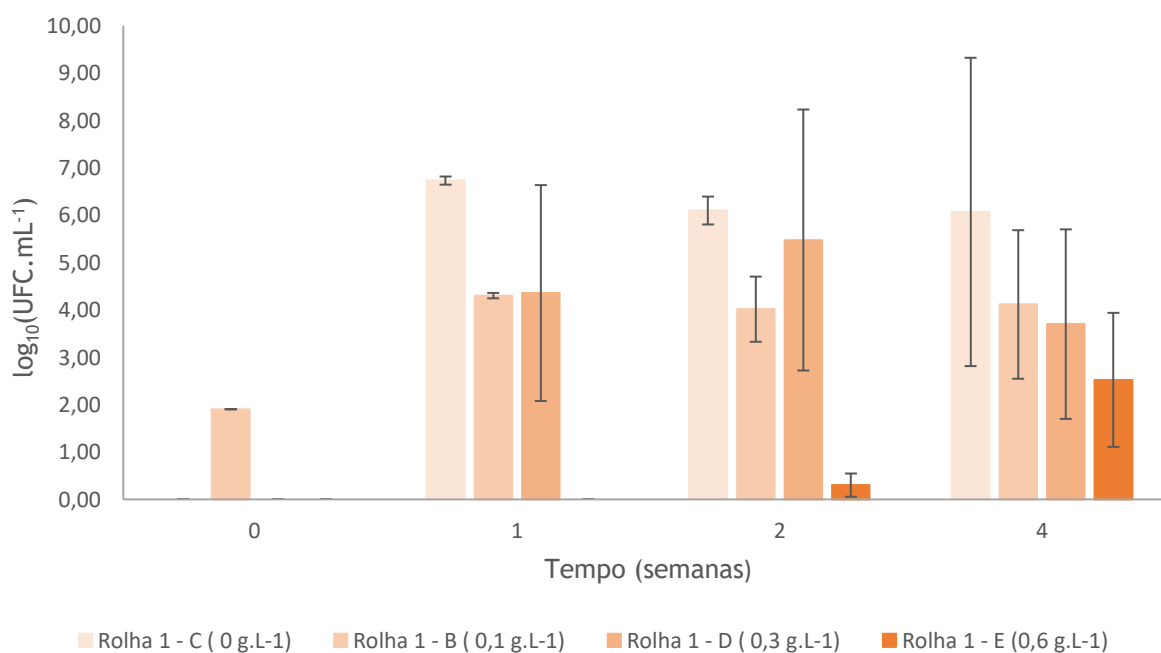


Figura 4.6 - Resultados da contagem de UFC para os simuladores B, C, D e E até às 4 semanas de ensaios para o PCA, respetivamente.

A Figura 4.7, representa os resultados obtidos relativo ao número UFC contabilizados para cada simulador em função do tempo de análise para o meio de PDA. Do mesmo modo, foram incluídos os resultados obtidos anteriormente com o simulador B até perfazerem 4 semanas. Os resultados obtidos, em número de UFC, para cada um dos simuladores nos meios de PCA e PDA encontram-se em Apêndice E.

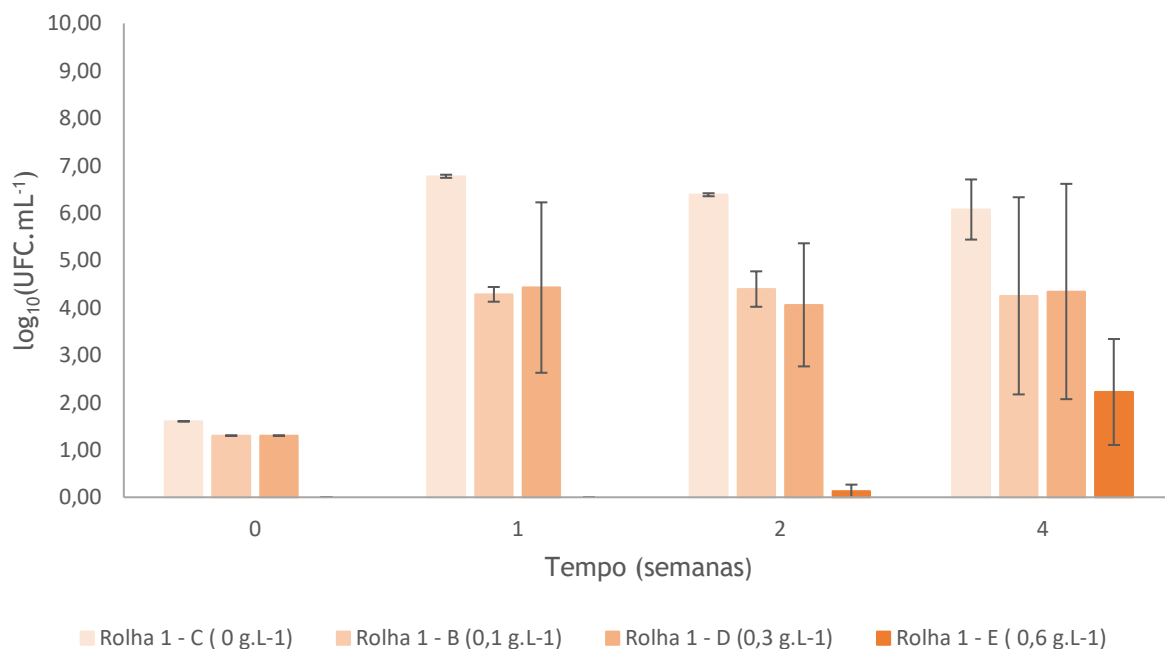


Figura 4.7 - Resultados, em número de UFC, para os simuladores B, C, D e E até às 4 semanas de ensaios para o PDA, respetivamente.

Pela observação de ambos os gráficos, deduz-se que o simulador com uma concentração de E-202 de 0,6 g·L⁻¹ é aquele que se destaca dos restantes no que diz respeito à inibição de microrganismos apresentando um $P < 0,05$ quando comparado com os restantes simuladores. Na semana 4, apesar de se verificar um aumento nos valores, quer no PCA como no PDA, estes não são significativos ($P > 0,05$) em relação à semana 3. Entre os simuladores com 0,1 g·L⁻¹ e 0,3 g·L⁻¹ não se verificam diferenças significativas ($P > 0,05$), visto apresentarem valores constantes e aproximados no decorrer dos ensaios. Por fim, o simulador sem E-202 exibe resultados mais elevados, em todas as semanas.

Estas conclusões, tanto no meio PCA como PDA, são concordantes e, juntamente com a mudança de cor observada na Figura 4.5, vêm confirmar a importância da utilização dos conservantes alimentares e que, na quantidade correta conseguem inibir o crescimento de microrganismos de forma significativa, neutralizando a influência da rolha na carga microbiana da bebida (García-García & Searle, 2016). É ainda importante realçar que houve alguma dificuldade na reprodutibilidade dos resultados pelo que é verificada uma elevada variabilidade.

4.3 Bebidas de controlo

Com o propósito de conseguir assegurar a fiabilidade e validade dos resultados comparativamente com o simulador não alcoólico, testaram-se duas bebidas comerciais de gin sem álcool de fornecedores diferentes, A e B, gin Gordon's 0,0% álcool, água e solução

etanólica a 12% (v·v⁻¹). Todas estas garrafas foram abertas e fechadas sob condições de assepsia.

4.3.1 Gin comercial A e B

Primeiramente, determinou-se a carga microbiológica inicial da bebida comercial A e B para as duas garrafas de 70 cL e para as duas garrafas de 500 mL com as diferentes rolhas, respetivamente. Os ensaios foram realizados ao longo de 10 semanas. Os resultados obtidos para a bebida A e B, em número de UFC, encontram-se em Apêndice F. Para uma melhor compreensão de ambos os resultados, optou-se por avaliar o método de filtração por vácuo por ser mais representativo tendo em conta a quantidade de amostra utilizada (13,5 mL). A principal limitação da utilização deste método é utilizar apenas como meio de cultura o PCA que é mais propício para a formação de bactérias, ainda que também se verificasse o crescimento de fungos. Atentar que também se poderia ter usado PDA como meio de cultura, mas assim, para cada tempo de análise, ter-se-iam que retirar cerca de 30 mL de uma só vez o que poderia comprometer a avaliação, na medida em que, uma menor quantidade de bebida estaria em contacto com a rolha.

A Figura 4.8 traduz a relação existente entre o número de bactérias e fungos quantificadas na bebida A e B sob a forma de UFC·mL⁻¹ das diferentes rolhas: a) Rolha 1 em contacto com a bebida A, b) Rolha sintética proveniente do fornecedor A em contacto com a bebida A; c) Rolha 1 em contacto com o gin B com sabor Original e d) Rolha 1 em contacto com o gin B sabor Ginger e Yuzu em função das 10 semanas de análise.

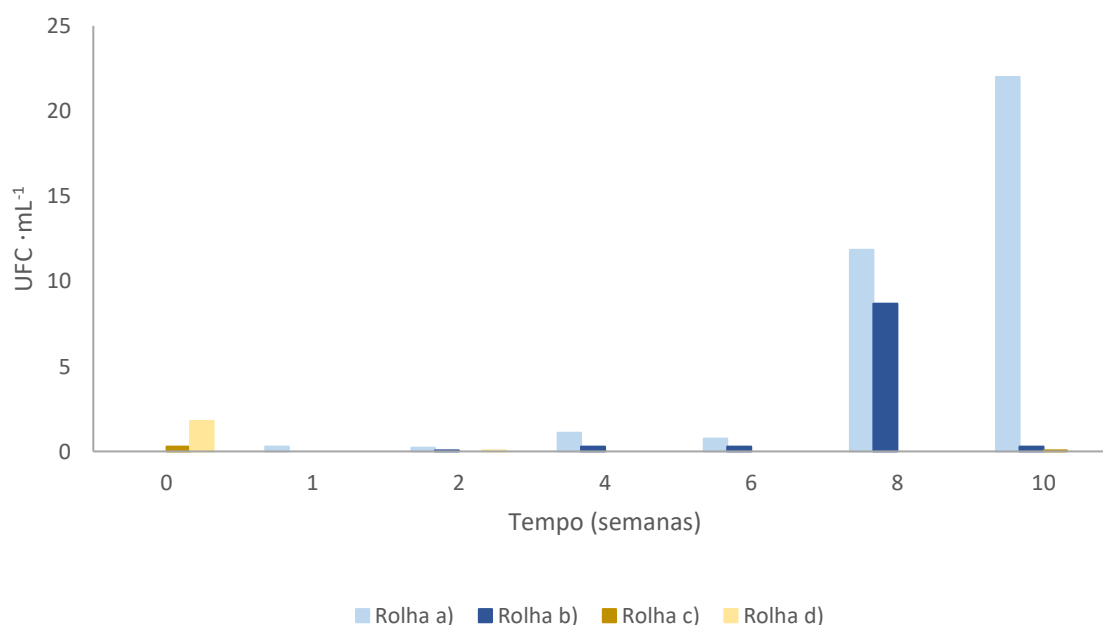


Figura 4.8 - Resultados obtidos para a bebida A e B, em UFC·mL⁻¹.

Pela observação da Figura 4.8, verifica-se que, inicialmente, até à 6ª semana para a bebida A, representada pelos tons azulados, não há praticamente a presença de nenhuma colónia. A partir daí e até à semana 10, a rolha 1 aparenta causar um crescimento mais acentuado. Já a rolha sintética apresenta um número de colónias (muito baixo) que se mantém constante, com exceção da semana 8 em que há proliferação dos microrganismos. Tal pode ser explicado por alguma contaminação aquando da realização do processo experimental pois na semana seguinte (10ª semana), é obtido um valor coerente com os anteriores à 8ª semana. Assim, a rolha sintética apresenta um melhor desempenho do que a rolha 1, visto que, ao longo do tempo, o número de colónias observados permaneceu constante e baixo.

Para a bebida B original e gengibre /yuzu, representada no gráfico por tons amarelados, constata-se que ao longo das 10 semanas de ensaios, não há qualquer tipo de crescimento observado. No entanto, no ponto controlo medido inicialmente, a bebida B com sabor de gengibre e yuzu, é detetada a presença de microrganismos o que não coincide com o esperado nem com o observado nos restantes tempos experimentais, pelo que se associa este valor a uma possível contaminação que ocorreu durante o processo experimental. Deste modo, infere-se que a utilização da rolha 1 com qualquer um dos sabores do fornecedor B - original e gengibre/yuzu não afetou a qualidade da bebida no que respeita ao aparecimento de contaminação microbiológica.

Para além disto, verifica-se que para a mesma rolha (Rolha 1) nas bebidas dos dois fornecedores, há uma diferença no número de microrganismos observado. Sendo que a rolha é produzida da mesma forma e está submetida às mesmas condições não haveria razão para que os resultados pudessem divergir a não ser pela própria bebida ou se houvesse uma contaminação pré-existente na rolha. Corroborando a criticidade da concentração de conservante na formulação da bebida, aqui também se conclui que a bebida pode ter influência no crescimento microbiano. Contudo, tendo em conta o intervalo de referência considerado para bebidas não alcoólicas, em $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ os resultados obtidos para ambos os casos estão até 5 ordens de grandeza abaixo deste, pelo que ambas as rolhas poderiam ser usadas sem comprometer a qualidade e a conservação da bebida (atendendo apenas a uma análise quantitativa da carga microbiológica).

4.3.2 Água e solução etanólica de 12% (v·v⁻¹)

Para a análise da água engarrafada é utilizado o método de espalhamento, diluição 0. Para uma maior precisão da análise, é recomendado que apenas sejam contadas as placas que tenham entre 30 a 300 UFC. Posto isto, verifica-se que quer para o meio de cultura PCA como PDA, tanto após a 1ª semana como a 2ª semana, há um número incontável de colónias, que ultrapassam as 300 tal como representado na Figura F.1 (Apêndice F). É de destacar que,

inicialmente, quando a água foi retirada da embalagem de plástico na qual vinha armazenada, foi feita a contagem de colónias presentes obtendo-se resultados em $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$, para o método de espalhamento, em PCA e PDA de, 2,15 e 1,20, respetivamente. Em Apêndice D, está demonstrada a fórmula de cálculo utilizado para obter estes valores, partindo do número de UFC contadas. Segundo a literatura, a quantidade de microrganismos encontrada em várias águas engarrafadas tem um valor de $3,42 \pm 0,14 \log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$ para os métodos de contagem total de microrganismos, de bactérias, fungos e leveduras (Hiko & Muktar, 2020). Assim sendo, os valores iniciais obtidos para a água engarrafada encontram-se conforme o esperado. Posto isto, conclui-se que a proliferação de microrganismos observada poderá ser resultado da interação da água com a rolha, uma vez que, inicialmente, esteve armazenada num garrafão de plástico e a contagem de microrganismos mostra-se abaixo do limite encontrado.

A solução etanólica a 12% ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$) é estudada como um referencial de controlo, isto é, de modo a perceber se com uma percentagem de álcool bastante mais reduzida do que a das bebidas espirituais (aproximadamente 40%) é o suficiente para inibir o crescimento de microrganismos. Pelas mesmas razões mencionadas na secção 4.2, também se escolheu utilizar o método de filtração por vácuo. Na Figura 4.9 estão apresentados os resultados obtidos.

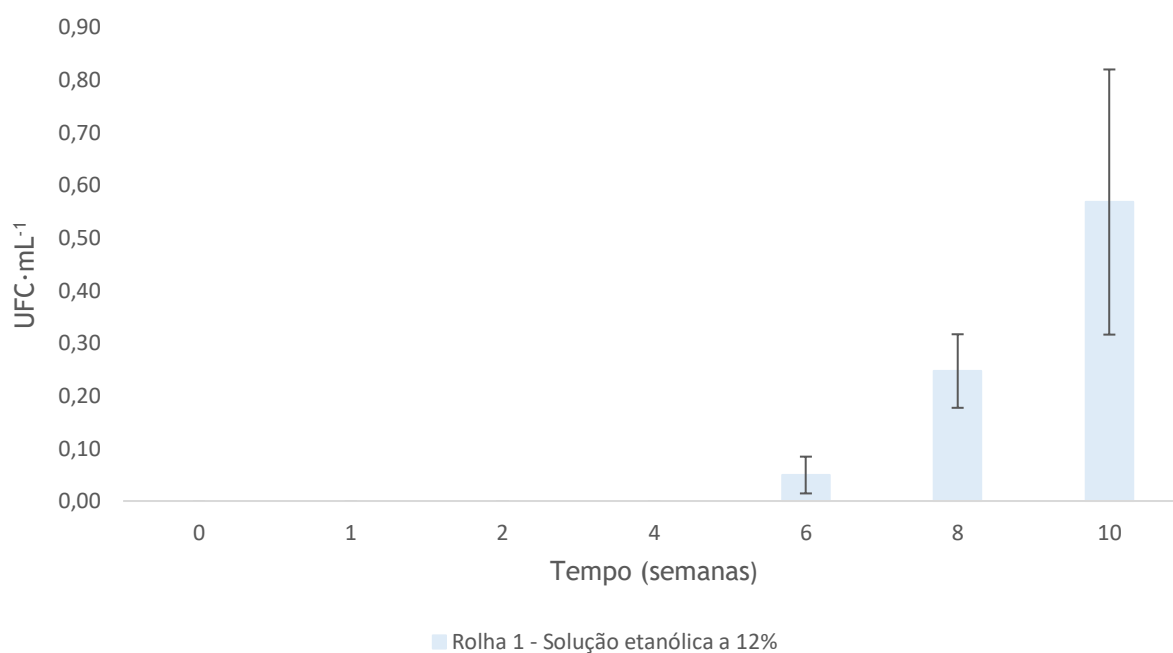


Figura 4.9 - Resultados obtidos, em $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, para a solução etanólica a 12% ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$).

É possível concluir que até à semana 6, e no ponto zero de amostragem não há qualquer tipo de proliferação quer a nível de fungos como de bactérias. Posteriormente, é verificada a presença de colónias, com valores de $0,05 \pm 0,03$, $0,25 \pm 0,07$ e $0,57 \pm 0,25 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$,

respetivamente. Contudo, estes são valores muito baixos e a eles está associada uma grande variabilidade (demonstrada pelos elevados desvios padrões) que acaba por retirar alguma credibilidade aos valores apresentados. Este resultado vem confirmar que, mesmo em quantidades mais baixas, o etanol apresenta uma função bactericida como para quantidades mais elevadas (a partir dos 40%) (Rodríguez-Andrade et al., 2020). Na Tabela F.3, em Apêndice F, encontram-se os resultados obtidos em UFC.

4.3.3 Gin Gordon's 0,0%

De forma a tentar obter resultados mais fidedignos e que complementem os anteriormente obtidos para o simulador não alcoólico B com $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de E-202, procedeu-se ao engarrafamento do gin Gordon a 0,0% em garrafas em contacto com os quatro tipos de rolhas presentes na Tabela 3.1. De salguardar que este gin difere dos anteriores (A e B) por ser distribuído por 12 garrafas de 350 mL, estando em contacto com todos os tipos de rolhas. Os outros são analisados na garrafa de origem e estão em contacto com a rolha 1 ou com a rolha sintética proveniente do fornecedor.

Tal como nas restantes bebidas, começou-se por medir o ponto de amostragem inicial para garantir que no início dos trabalhos experimentais não havia a presença de quaisquer microrganismos. Por se tratar de uma bebida comercial e pelos mesmos motivos apresentados na secção 4.2, escolheu-se analisar o método de filtração por vácuo.

Aqui, na Figura 4.10, representa-se a quantidade de microrganismos em $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ em função das 4 semanas de avaliação para a rolha 1, 2, 3 e 4.

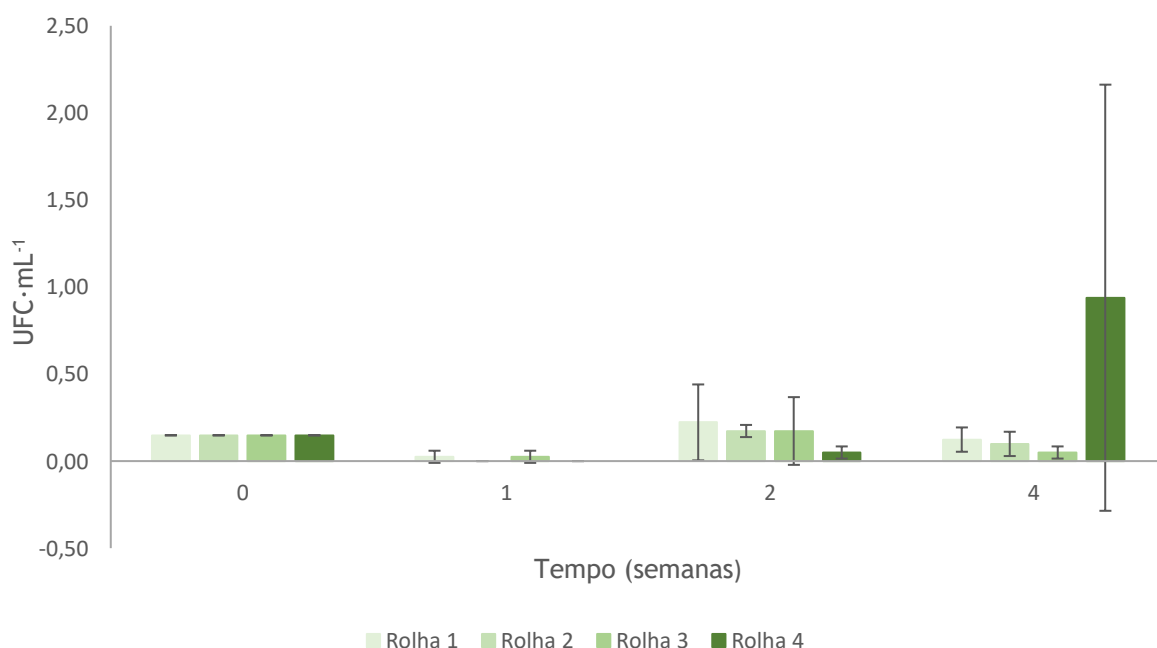


Figura 4.10 - Resultados obtidos para a bebida Gordon's 0,0%, pelo método de filtração por vácuo durante 4 semanas.

Uma primeira análise permite inferir que para as rolhas 1, 2 e 3, os valores de contaminação obtidos permanecem constantes e bastante inferiores ao intervalo de referência considerado, aproximadamente em 4 ordens de grandeza, em UFC·mL⁻¹. Já para a rolha 4, é observado um elevado crescimento de microrganismos na 4^a e última semana, ao qual se associa um elevado desvio padrão e por isso, uma maior dispersão de valores. Tal pode ser justificado pelos restantes resultados para a semana 4, apresentados na Tabela F.4 (Apêndice F), serem bastante baixos. Todavia, mesmo para a rolha 4, os resultados são, em quatro ordens de grandeza inferiores à referência. Ora, tendo apenas em conta este tempo de avaliação e assumindo que a rolha 1, 2 e 3 mantêm o seu comportamento, conclui-se que estas poderão ser utilizadas com bebidas espirituosas não alcoólicas assegurando que a qualidade das mesmas é mantida. Contudo, é de ressaltar que apenas foi feita uma análise quantitativa e por isso, não se sabe quais os microrganismos que cresceram na bebida. No que toca à rolha 4, devido à subida acentuada demonstrada na última semana de análise e ao desvio padrão enorme, não se podem fazer ilações pelo que o melhor seria prosseguir com os ensaios e posteriormente, tecer conclusões. Isto é, tentar perceber se o resultado obtido é fruto de uma contaminação ou se há uma tendência crescente nesta variável.

4.4 Aditivo antimicrobiano

Paralelamente aos ensaios anteriores, foram realizados testes que envolveram o uso de um aditivo antimicrobiano na rolha. O modo de atuação deste aditivo passa por libertar, de forma gradual iões de prata de modo a inibir a contaminação microbiana e prolongar o tempo de vida da bebida. Estes ensaios têm como principal objetivo tentar avaliar o impacto que a adição de um aditivo antimicrobiano a uma rolha PWS pode ter a nível de compatibilidade com o material de cortiça e na preservação da bebida com que está em contacto. A bebida utilizada foi Gordon's 0,0%. Com o propósito de detetar o maior número de microrganismos possível, utilizou-se o método de filtração por vácuo.

A Figura 4.11 ilustra a quantidade de microrganismos observados em UFC·mL⁻¹ em função das duas semanas de análise para a rolha 4 sem e com aditivo antimicrobiano.

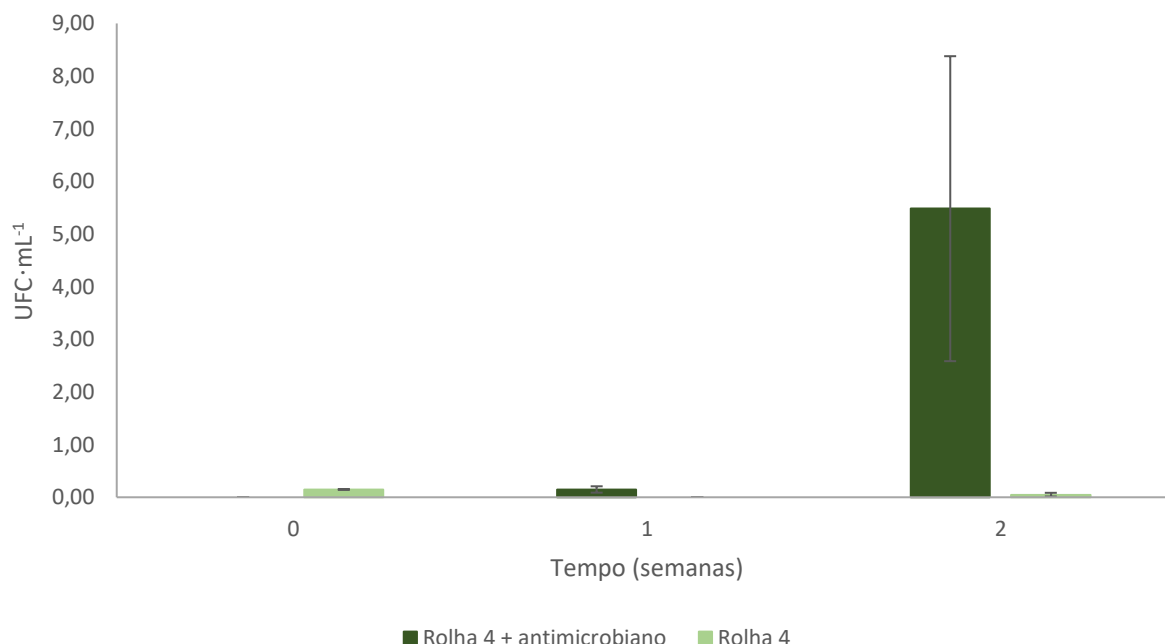


Figura 4.11 - Resultados obtidos para a bebida Gordon's 0,0% quando em contacto com a rolha 4 com e sem aditivo antimicrobiano.

É possível evidenciar um crescimento do número de microrganismos contabilizados para o caso em que o aditivo antimicrobiano está presente. De acordo com a ISO 22196:2011 (para plásticos e superfícies não porosas), este aditivo, baseado em iões de prata consegue reduzir até 99,9% o crescimento de bactérias, em particular, de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Campylobacter* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (SARM). Ainda que a rolha de cortiça seja porosa, esperar-se-ia que o aditivo tivesse uma ação semelhante e por isso, a contaminação da bebida fosse inexistente ou inferior à apresentada pela rolha 4 sem o aditivo, o que não é verificado (Helaly et al., 2017). Não há uma explicação imediata para que tal se tenha verificado. Contudo, este teste só teve a duração de 2 semanas (um espaço de tempo muito curto) o que é uma desvantagem e não permite tirar conclusões acerca da tendência que se poderia vir a observar. De salientar que o intervalo de referência considerado é 2137 - 12302 UFC·mL⁻¹ pelo que todos os valores se encontram muito abaixo deste.

5 Conclusões

O principal propósito deste trabalho foi: a) estudar a evolução da contaminação microbiológica de uma bebida em contacto com uma rolha de cortiça e comparação desta evolução com a de uma rolha sintética e; b) identificar qual o tipo de rolha - microaglomerada *standard* (1), microaglomerada com tratamento UV (2), compósita/sintética (3) e microaglomerada com tratamento PWS (4) - que apresentava o melhor comportamento em relação à inibição de bactérias e fungos através da utilização de dois meios de cultura distintos, PCA e PDA.

O estudo foi efetuado com recurso à formulação de uma bebida espirituosa não alcoólica sintética (simulador) e a três tipos diferentes de gin sem álcool presentes no mercado atual. Este tipo de bebidas tem vindo a ter cada vez mais procura devido ao gradual reconhecimento da importância da adoção de um estilo de vida saudável.

A definição dos compostos e das respetivas quantidades para que o simulador tivesse uma composição o mais próxima possível das bebidas reais foi um dos principais desafios encontrados. Primeiramente, para o simulador B, com uma concentração de $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sorbato de potássio, E-202, inferiu-se que a realização da abertura e do fecho das garrafas sob condições de assepsia não se refletiu nos resultados de forma considerável quer no PCA como no PDA quando comparado com os ensaios cuja abertura e fecho foi feito na ausência destas condições. Além disto, constatou-se que a rolha 1, sem qualquer alteração ao tipo de tratamento de superfície aplicado do processo *standard* foi a que menor impacto teve no crescimento de bactérias e fungos na bebida ao longo do tempo. A rolha 4 foi a que exibiu um comportamento mais prejudicial neste controlo. De salientar que os resultados obtidos se encontravam, no conjunto total de análise, acima do intervalo de referência considerado $3,33 - 4,09 \log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$. Posto isto, concluiu-se que a concentração de E-202, tem um papel fulcral na prevenção da contaminação microbiana. Para uma concentração de $0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, a quantidade máxima permitida em chás e infusões, até às 4 semanas verifica-se uma diferença significativa na inibição do crescimento de microrganismos. Só no simulador com esta concentração de E-202, a carga microbiana é inferior aos valores de referência.

No que diz respeito às bebidas comerciais facultadas pelo fornecedor A e B, verificou-se que para qualquer das rolhas utilizadas, rolha 1 e rolha sintética proveniente do fornecedor, os resultados foram sempre bastante inferiores à referência e que dependendo da bebida, A ou B, a mesma rolha apresentou um desempenho diferente. Relativamente ao gin Gordon's, as 4 rolhas estudadas permitiram obter resultados bons e estáveis com exceção da rolha 4 que, na última semana de avaliação, teve um crescimento súbito de microrganismos. Contudo, todos os valores obtidos estão até cerca de 5 ordens de grandeza abaixo da referência.

De forma geral, concluiu-se que, conforme se previa, o teor de álcool na bebida tem um papel fundamental na proliferação de microrganismos, que a rolha 1, utilizada atualmente, é a que se destaca para futura aplicação em bebidas espirituosas não alcoólicas, apresentando na maior parte dos casos um melhor comportamento do que a rolha sintética, e que a formulação da bebida e a quantidade de conservantes presentes na mesma tem um efeito crítico na conservação da qualidade da bebida em relação à carga microbiana.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

Os principais objetivos do trabalho realizado consistiram na formulação de um simulador de uma bebida espirituosa não alcoólica; na avaliação de diversos tipos de rolha, microaglomerada ou sintética e na aplicação de tratamentos de superfície nestas, por radiação UV e com um elastómero de silicone de modo a verificar qual delas era a mais eficaz a travar a proliferação de microrganismos quando em contacto com diferentes bebidas. Adicionalmente outro dos objetivos passou por encontrar aditivos antimicrobianos possíveis de serem incorporados no tratamento com elastómero de silicone e perceber a sua validade para a diminuição do crescimento de microrganismos nas bebidas sem ou com reduzido teor alcoólico.

A formulação do simulador de uma bebida espirituosa não alcoólica foi um objetivo parcialmente cumprido, na medida em que os componentes deste não se encontravam nas quantidades mais adequadas para obter resultados fiáveis, mas apresentaram-se soluções para que este pudesse ser melhorado. Os restantes objetivos foram alcançados.

6.2 Limitações e recomendações futuras

A maior limitação deste estudo foi encontrar uma formulação adequada do simulador não alcoólico que correspondesse à realidade e permitisse obter resultados conclusivos em relação à rolha que melhor cumpria a sua função de dificultar a propagação de microrganismos, nomeadamente, bactérias e fungos. Como consequência, o tempo de estudo também revelou ser um entrave uma vez que ao se alterar a composição do simulador, os ensaios laboratoriais foram atrasados e o tempo total de análise inicialmente previsto, de 12 semanas, foi reduzido.

Nesta dissertação foram mostradas, já numa fase mais tardia do projeto, as diferentes alternativas existentes relativas à definição dos componentes necessários para a elaboração de um simulador não alcoólico. Tendo por base aquilo que foi observado para as quantidades de sorbato de potássio utilizado, constatou-se que com uma concentração de $0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de E-202 os resultados poderiam estar mais próximos da realidade de uma bebida espirituosa sem álcool. Assim sendo, como trabalho futuro, seria interessante fazer um estudo do comportamento das diversas rolhas com este simulador e perceber se este conservante alimentar, nesta quantidade, seria suficiente para se obter, a longo prazo, resultados muito semelhantes a bebidas comerciais. Caso esta alteração não se mostrasse suficiente, poder-se-ia tentar compreender se a junção de mais algum conservante alimentar (também presente nas bebidas espirituosas

sem álcool) tal como benzoato de sódio e dicarbonato de metila seria benéfica ou se a quantidade de açúcar ou do chá necessita de ser modificada.

Para além disto, na maioria dos ensaios feitos utilizou-se o método de filtração por vácuo que, apesar da sua principal vantagem ser a sua capacidade para detetar um maior número de microrganismos devido à elevada quantidade de líquido avaliado, esta pode ser também a sua principal desvantagem. Isto porque ao retirar uma quantidade de líquido elevada em relação à quantidade total de líquido contido nas garrafas (na ordem dos 15 mL) em todos os ensaios, a quantidade de líquido que permanece em contacto com a rolha diminui, o que pode ter afetado os resultados.

No que tange à adição de aditivos antimicrobianos, e visto que foram encontrados diferentes tipos de antimicrobianos passíveis de serem combinados com o tratamento de superfície de PWS, poderia ser realizado o mesmo estudo, por um período mais extenso, com estas diversas opções e tentar perceber qual delas é capaz de mostrar melhores resultados e se, efetivamente, a adição destes é necessária.

6.3 Apreciação Final

A presente dissertação apresenta um estudo relevante relativo ao tipo de rolhas de cortiça que podem ser mais adequadas para utilizar com bebidas espirituosas não alcoólicas, um produto que tem vindo a ser cada vez mais procurado. Tal facto deve-se à crescente valorização da importância de uma vida saudável. Revela, também, o quão importante é a colaboração e parceria nos campos da investigação científica e empresarial e quão frutuosa pode ser um trabalho em conjunto.

É útil, do ponto de vista, em que ajuda a perceber quais os componentes das bebidas espirituosas não alcoólicas e em que medida eles podem ser benéficos para controlar a carga microbiana. E, ainda, por avaliar o efeito de rolhas diferentes quando em contacto com bebidas, também diferentes.

Apesar de terem sido encontradas algumas dificuldades ao longo do trabalho realizado, estas foram ultrapassadas sempre no sentido de perceber onde estava a falha e o que poderia ser feito para as superar.

7 Referências

- Alvarez-Rodríguez, M. L., López-Ocaña, L., López-Coronado, J. M., Rodríguez, E., Martínez, M. J., Larriba, G., & Coque, J. J. (2002). Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by o methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Appl Environ Microbiol*, 68(12), 5860-5869. <https://doi.org/10.1128/aem.68.12.5860-5869.2002>
- American Society for, M. (1957). *Manual of microbiological methods*. McGraw-Hill. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/31003>
- Andrii, T., Miguel, C., Christophe, L., Paulo, L., Christoph, S., & Rainer, J. (2022). State-of-the-Art Knowledge about 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) and Strategies to Avoid Cork Taint in Wine. In M. Antonio, L. Iris, & G. Carmen (Eds.), *Grapes and Wine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.103709>
- APCOR. (2015). *Technical guide cork stoppers* (APCOR, Ed.). APCOR. https://www.apcor.pt/wp-content/uploads/2016/01/ManualRolhas_EN_VF.pdf
- APCOR. (2018). *Percurso industrial*. APCOR. <https://www.apcor.pt/cortica/processo-de-transformacao/percurso-industrial/>
- Bellotti, N., & Deyá, C. (2019). Chapter 14 - Natural Products Applied to Antimicrobial Coatings. In R. Atta ur (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 60, pp. 485-508). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00014-0>
- BIOSAFE *Organosilane antimicrobials*. (2023). <https://technical.gelest.com/brochures/biosafe/biosafe-organosilane-antimicrobials/#biosafe-organosilane-antimicrobials>
- Boczek, L. A., Rice, E. W., & Johnson, C. H. (2014). TOTAL VIABLE COUNTS | Spread Plate Technique. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 636-637). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00331-1>
- Cao, H., Wei, D., Yang, Y., Shang, Y., Li, G., Zhou, Y., Ma, Q., & Xu, Y. (2017). Systems-level understanding of ethanol-induced stresses and adaptation in E. coli. *Scientific Reports*, 7(1), 44150. <https://doi.org/10.1038/srep44150>
- Cappitelli, F., & Sorlini, C. (2008). Microorganisms attack synthetic polymers in items representing our cultural heritage. (1098-5336 (Electronic)).
- Chaudhary, A., Dwivedi, A., & Upadhyayula, S. (2021). Chapter 28 - Supercritical fluids as green solvents. In B. Kharisov & O. Kharissova (Eds.), *Handbook of Greener Synthesis of Nanomaterials and Compounds* (pp. 891-916). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821938-6.00028-1>
- Chiozzi, V., Agriopoulou, S., & Varzakas, T. (2022). Advances, Applications, and Comparison of Thermal (Pasteurization, Sterilization, and Aseptic Packaging) against Non-Thermal (Ultrasounds, UV Radiation, Ozonation, High Hydrostatic Pressure) Technologies in Food Processing. *Applied Sciences*, 12. <https://doi.org/10.3390/app12042202>
- Cole, G. T. (1996). Basic Biology of Fungi. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Deng, L. Z., Mujumdar, A. S., Pan, Z., Vidyarthi, S. K., Xu, J., Zielinska, M., & Xiao, H. W. (2020). Emerging chemical and physical disinfection technologies of fruits and vegetables: a comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60(15), 2481-2508. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1649633>

- Duarte, A. P., & Bordado, J. C. (2015). Cork - A Renewable Raw Material: Forecast of Industrial Potential and Development Priorities. *Frontiers in Materials*, 2296-8016.
- Durán, N., Nakazato, G., & Seabra, A. B. (2016). Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(15), 6555-6570 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7657-7>
- Código Internacional das práticas rolheiras, (2013).
- García-García, R., & Searle, S. S. (2016). Preservatives: Food Use. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 505-509). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00568-7>
- Gkana, E. N., Doulgeraki, A. I., Chorianopoulos, N. G., & Nychas, G.-J. E. (2017). Anti-adhesion and Anti-biofilm Potential of Organosilane Nanoparticles against Foodborne Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 1295-1295 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01295> %M 28744277
- Gray, N. F. (2014). Chapter Thirty-Four - Ultraviolet Disinfection. In S. L. Percival, M. V. Yates, D. W. Williams, R. M. Chalmers, & N. F. Gray (Eds.), *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)* (pp. 617-630). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00034-2>
- Hamida, M. E. (2019). Effectiveness of ethanol and methanol alcohols on different isolates of staphylococcus species. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open access*, 7, 71-73 <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2019.07.00247>
- Helaly, F. M., El-Sawy, S. M., Hashem, A. I., Khattab, A. A., & Mourad, R. M. (2017). Synthesis and characterization of nanosilver-silicone hydrogel composites for inhibition of bacteria growth. *Cont Lens Anterior Eye*, 40(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2016.09.004>
- Hiko, A., & Muktar, Y. (2020). Levels of microbial contamination in non-alcoholic beverages from selected eastern Ethiopian towns markets. *Scientific African*, 7, 2468-2276. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00223>
- How are non-alcoholic Spirits made ? (2022). Craftzero. <https://www.craftzero.com.au/blogs/craftzero-life/how-are-non-alcoholic-spirits-made>
- Jett, B. D., Hatter, K. L., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1997). Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques*, 23(4), 648-650. <https://doi.org/10.2144/97234bm22>
- Juvonen, R., Virkajärvi, V., Priha, O., & Laitila, A. (2011). *Microbiological spoilage and safety risks in non-beer beverages*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3166.8562>
- Khorrami, S., Zarrabi, A., Khaleghi, M., Danaei, M., & Mozafari, M. R. (2018). Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 8013-8024 <https://doi.org/10.2147/ijn.S189295> %m 30568442
- Kim, Y.-H., Jeong, S.-G., Back, K.-H., Park, K.-H., Chung, M.-S., & Kang, D.-H. (2013). Effect of various conditions on inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, and Listeria monocytogenes in fresh-cut lettuce using ultraviolet radiation. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 349-355. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.010>
- Koutchma, T. (2009). Advances in Ultraviolet Light Technology for Non-thermal Processing of Liquid Foods. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 138-155 <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0178-3>

- Lansdown, A. B. (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol*, 33, 17-34. <https://doi.org/10.1159/000093928>
- Leite, C., & Pereira, H. (2017). Cork-Containing Barks—A Review [Review]. *Frontiers in Materials*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmats.2016.00063>
- Mazurek, P., Vudayagiri, S., & Skov, A. L. (2019). How to tailor flexible silicone elastomers with mechanical integrity: a tutorial review. *Chemical Society Reviews*, 48(6), 1448-1464. <https://doi.org/10.1039/c8cs00963e>
- Mendes, A. (2002). *A economia do sector da cortiça em Portugal. Evolução das actividades de produção e de transformação ao longo dos séculos XIX e XX (Documento de Trabalho) %!* *A economia do sector da cortiça em Portugal. Evolução das actividades de produção e de transformação ao longo dos séculos XIX e XX*
- Mhalgi, S., & Deshmukh, R. (2022). *Non-alcoholic Spirits Market by Product Type (Whiskey, Rum, Vodka, Tequila, Others), by Category (Conventional, Organic), by Distribution Channel (Food Service, Food Retail): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021-2031* (A31316). <https://www.alliedmarketresearch.com/non-alcoholic-spirits-market-A31316>
- Mulvany, J. G. (1969). Chapter VII Membrane Filter Techniques in Microbiology. In J. R. Norris & D. W. Ribbons (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 1, pp. 205-253). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70138-7](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70138-7)
- NielsenIQ. (2022). *Non-alcoholic beverage trends in the US*. <https://nielseniq.com/global/en/insights/education/2022/non-alcoholic-beverage-trends-in-the-us/#infographic>
- Nwaiwu, O., Aduba, C. C., Igbokwe, V. C., Sam, C. E., & Ukwuru, M. U. (2020). Traditional and Artisanal Beverages in Nigeria: Microbial Diversity and Safety Issues. *Beverages*, 6(3).
- Oliveira, V., & Pereira, H. (2020). Cork and Cork Stoppers: Quality and Performance. In C. Fernanda, M. N. Fernando, & F.-R. Luís (Eds.), *Chemistry and Biochemistry of Winemaking, Wine Stabilization and Aging* (pp. Ch. 10 %! Cork and Cork Stoppers: Quality and Performance %@ 978-971-83962-83576-83963). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92561>
- Paramithiotis, S., Katidi, A., & Drosinos, E. H. (2021). Transcriptomic Response of *L. monocytogenes* to Co-Culture with *S. cerevisiae*. *Beverages*, 7(3).
- Petkovic, V., Novakovic, B., & Rudic Grujic, V. (2009). Health safety of non-alcoholic drinks in reference to use of preservatives. *HealthMED*, 3, 442-447
- Pietikäinen, J., Pettersson, M., & Bååth, E. (2005). Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(1), 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.10.002>
- PORTFÓLIO.CADA ROLHA TEM UMA HISTÓRIA. (2023). Amorim Cork. <https://www.amorimcork.com/pt/portfolio/>
- Ramkumar, V. S., Pugazhendhi, A., Gopalakrishnan, K., Sivagurunathan, P., Saratale, G. D., Dung, T. N. B., & Kannapiran, E. (2017). Biofabrication and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of seaweed *Enteromorpha compressa* and its biomedical properties. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 14, 1-7 <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.02.001> %M 28459002
- Recio, E., Rodríguez, M. L., Rumbero, Á., Garzón, E., & Coque, J.-J. (2011). Destruction of Chloroanisoles by Using a Hydrogen Peroxide Activated Method and Its Application To Remove Chloroanisoles from Cork Stoppers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 12589-12597 <https://doi.org/10.1021/jf2035753>

- Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives (Text with EEA relevance)Text with EEA relevance. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008R1333-20181029&rid=1>
- Rodríguez-Andrade, E., Stchigel, A. M., Guarro, J., & Cano-Lira, J. F. (2020). Fungal Diversity of Deteriorated Sparkling Wine and Cork Stoppers in Catalonia, Spain. *Microorganisms*, 8(1).
- Rosa system winning the war against TCA. (2015). APCOR. <https://www.apcor.pt/wp-content/uploads/2015/09/ROSA-Focus-Issue.pdf>
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2016). Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: An Overview and Current Issues. *Infect Dis Clin North Am*, 30(3), 609-637. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.04.002>
- Sagen, A. (2023). *Plate Count Agar v1*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.eq2ly74delx9/v1>
- Sauerbrei, A. (2020). Bactericidal and virucidal activity of ethanol and povidone-iodine [10.1002/mbo3.1097]. *MicrobiologyOpen*, 9(9), e1097. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mbo3.1097>
- Schillaci, M. A., & Schillaci, M. E. (2022). Estimating the population variance, standard deviation, and coefficient of variation: Sample size and accuracy. *Journal of Human Evolution*, 171, 103230. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2022.103230>
- Shankar, V., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Ahmed, Z., Al-Mulhm, N., & Govindarajan, M. (2021). A review on microbial degradation of drinks and infectious diseases: A perspective of human well-being and capabilities. *Journal of King Saud University - Science*, 33(2), 101293. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101293>
- Siddiquee, S. (2017). The Basic Concept of Microbiology. *Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of Trichoderma Species from Tropical Regions*, 1-15. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7_1
- Silva, S., Sabino, M., Fernandes, E., Correlo, V., Boesel, L., & Reis, R. L. (2005). Cork: Properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50, 345-365 <https://doi.org/10.1179/174328005x41168>
- Smalheiser, N. R. (2017). Chapter 11 - ANOVA. In N. R. Smalheiser (Ed.), *Data Literacy* (pp. 149-155). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811306-6.00011-7>
- SpiritsEurope. (2022). Guidance document on non & low alcoholic spirits. <https://spirits.eu/upload/files/publications/guidance%20document%20on%20low%20and%20no%20-%20high%20resolution.pdf>
- Tantray, J. A., Mansoor, S., Wani, R. F. C., & Nissa, N. U. (2023). Chapter 6 - Principle and working of laminar. In J. A. Tantray, S. Mansoor, R. F. C. Wani, & N. U. Nissa (Eds.), *Basic Life Science Methods* (pp. 21-25). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19174-9.00006-4>
- Tavares, A. O. (2021). *Processo de Esterilização de Granulado de Cortiça* Universidade do Porto]. <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/134969>
- Tecnologia para a eliminação, por radiação gama, dos microorganismos e do TCA nas rolhas de cortiça. (2014). http://www.ctn.tecnico.ulisboa.pt/facilities/lfi/2014_Folheto-Vitivicultura.pdf
- Thomas, A. T., & M.Shipman, F. (2023). distilled spirit. *Britannica*. <https://www.britannica.com/topic/distilled-spirit>
- top series área expert. (2023). <https://www.amorimtopseries.com/pt/top-series-expert/>

- Torres-Guardado, R., Esteve-Zarzoso, B., Reguant, C., & Bordons, A. (2022). Microbial interactions in alcoholic beverages. *International Microbiology*, 25, 3. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00200-1>
- The ultimate guide to non-alcoholic spirits.* (2021). NIO cocktails. <https://niococktails.co.uk/blogs/news/the-ultimate-guide-to-non-alcoholic-spirits>
- Veloso, S. M. F. (2014). *Identificação da micoflora associada à cortiça crua com o defeito da “mancha amarela”* Instituto Superior de Agronomia].
- Xpür. (2021). <https://www.amorimcork.com/pt/portfolio/d/xpur/407/>
- Yemmireddy, V., Adhikari, A., & Moreira, J. (2022). Effect of ultraviolet light treatment on microbiological safety and quality of fresh produce: An overview. *Frontiers in Nutrition*, 9 <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.871243>

Anexo A - Critérios de identificação de colónias de bactérias e fungos

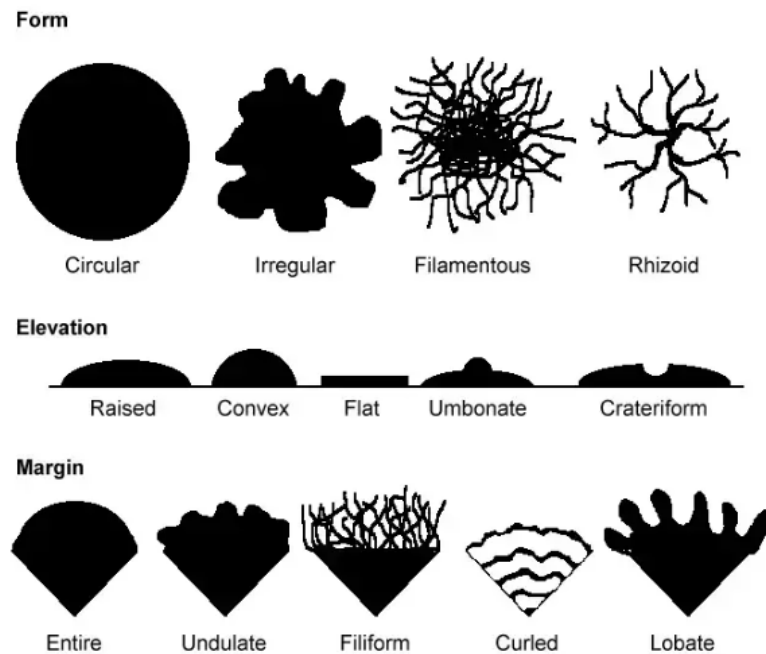


Figura A.0.1 - Critérios de classificação visual / morfologia das colónias de bactérias e fungos (American Society for, 1957).

Apêndice A - Cálculos efetuados para preparar o simulador não alcoólico

Este apêndice descreve o método de cálculo utilizado para preparar o simulador não alcoólico. Tendo em conta que são necessárias 24 garrafas de 350 mL, são precisos, por excesso, 10 L em que são necessários 5 g de chá de jasmim em pó para cada 500 mL de água, o que perfaz uma concentração de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcar e $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de E-202. Assim sendo, pela utilização da equação A.1., são obtidas as quantidades totais necessárias de cada um destes compostos 100, 200 e 1 g, respetivamente.

$$\text{Concentração}_{\text{mássica}}\left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = \frac{\text{massa (g)}}{\text{volume (L)}} \quad \text{Eq.A.1}$$

Optou-se por preparar uma solução de 5 L na sua forma concentrada, isto é, com as quantidades totais de cada um dos compostos acima referidos e com água potável para completar o restante volume. Posteriormente, foram realizadas diluições, em que para se saber o volume a retirar dessa mesma solução utiliza-se a equação A.2.

$$C_i\left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) \times V_i (\text{L}) = C_f\left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) \times V_f (\text{L}) \quad \text{Eq.A.2}$$

Onde C_i corresponde à concentração da solução concentrada, V_i ao volume a retirar da solução concentrada, C_f à concentração real do simulador alcoólico e V_f ao volume final da solução (5 L).

Deste modo, retiram-se 2,5 L da solução concentrada para um novo recipiente de 5 L, em que se utiliza água engarrafada para perfazer o restante volume. Deste modo, no total, são precisos, 3 recipientes. Um deles para a solução concentrada e outros dois para diluir esta solução.

Apêndice B - Procedimento laboratorial

Este apêndice apresenta o material utilizado para realizar a esterilização por radiação UV, na Figura B.1 e descreve, ainda, o procedimento laboratorial adotado ao longo da presente dissertação para preparar o simulador não alcoólico microbiológica das rolhas de cortiça na Figura B.2.



Figura B.1 - Câmara de fluxo laminar para esterilização UV

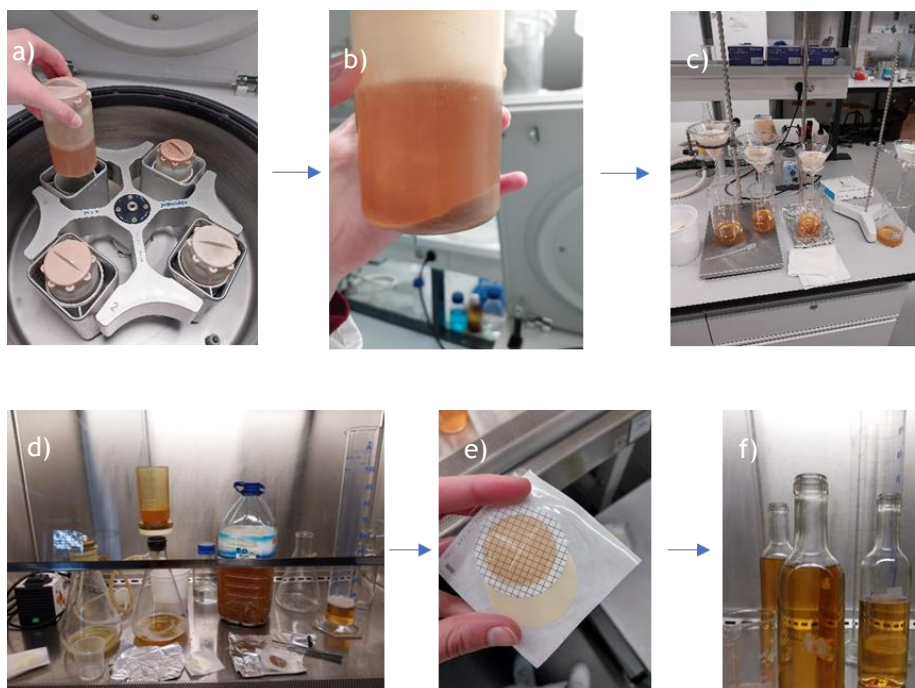


Figura B.2 - Metodologia utilizada para a preparação do simulador não alcoólico com chá de jasmim a) centrifugação b) após 5 min de centrifugação a 4000 rpm; c) filtração simples com um filtro Whatman número 1; d) filtração por vácuo dentro da câmara de fluxo laminar com um filtro de 0,45 μ m; e) filtro após filtração; f) solução final.

Apêndice C - Resultados obtidos para o simulador B

Na Figura C.1 a), apresenta-se a diferença entre uma placa de PDA e uma placa de PDA depois do espalhamento. De forma análoga, na Figura C.1 b) compara-se uma placa de PCA não sujeita e sujeita ao método de espalhamento do simulador não alcoólico, respetivamente.

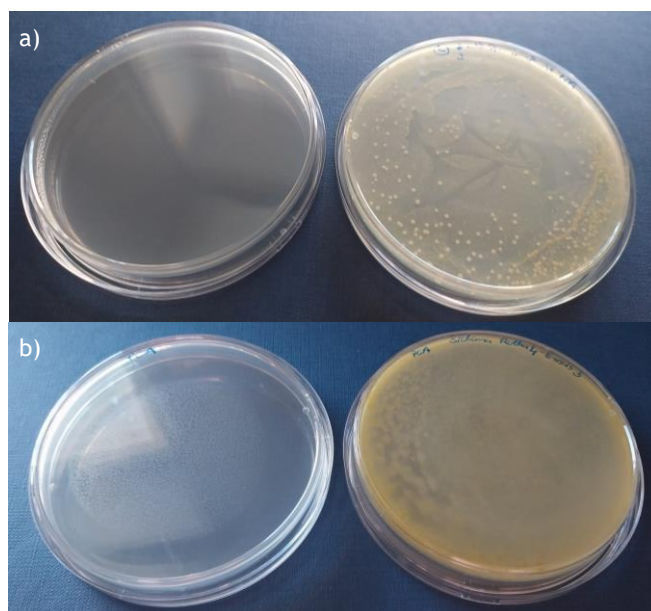


Figura C.1 - Resultados após uma semana para a) Placa de PDA versus Placa de PDA com formação de colónias de leveduras b) Placa de PCA versus Placa de PCA com formação de bactérias e fungos.

De seguida, analisam-se os resultados obtidos para a diluição de 10^{-1} e para a filtração por vácuo realizada. A Figura C.2 e C.3 apresentam alguns exemplos de cada um desses resultados. Estes traduzem, de forma geral, a realidade de todos os resultados obtidos para estes métodos.



Figura C.2 - Resultados após uma semana para o método de diluição a 10^{-1} .

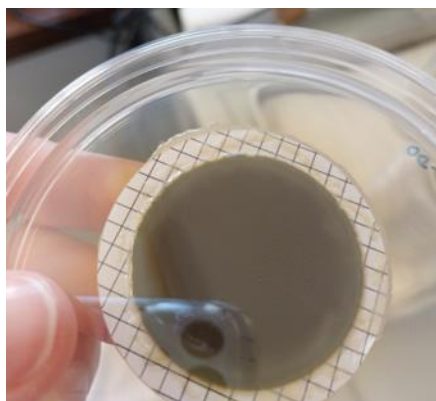


Figura C.3 - Resultados do método de filtração após uma semana.

Apêndice D - Cálculo dos resultados obtidos em $\log(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$

Em cada uma das placas com os meios de cultura, foram contadas as respectivas unidades formadoras de colónias (UFCs). De forma a simplificar a interpretação dos resultados tendo em conta os vários fatores associados à rolha, estes podem ser apresentados na forma de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou $\log_{10}(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$, obtidos a partir da equação D.1 e D.2, respetivamente.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{UFC}}{V_{\text{gota}}} \times 10^D \quad \text{Eq. D.1}$$

$$\log\left(\frac{\text{UFC}}{\text{ml}}\right) = \log\left(\frac{\text{UFC}}{V_{\text{gota}}} \times 10^D\right) \quad \text{Eq. D.2}$$

Em que, V_{gota} , corresponde ao volume da gota (mL) e D, à diluição efetuada.

No caso do método da gota, as variáveis acima mencionadas têm o valor de 0,01 mL e 1,2 e 3 dependendo do fator de diluição associado. O método de espalhamento assume os valores de 0,5 mL e 0. E por fim, na filtração por vácuo os valores são 13,5 mL e 0.

Apêndice E - Simulador não alcoólico com uma concentração de E-202 de 0, 0,1, 0,3 e 0,6 g·L⁻¹

Nesta secção são apresentados as UFC contabilizadas para todos os simuladores ao longo de todo o tempo experimental.

Tabela E.1 - Resultados, em UFC, para todos os simuladores no ponto de amostragem inicial.

Ponto inicial de amostragem	Número de UFC	
	Método de espalhamento (fator de diluição 0)	
	PCA	PDA
Simulador B (0,1 g·L ⁻¹)	4	1
Simulador C (0 g·L ⁻¹)	0	2
Simulador D (0,3 g·L ⁻¹)	0	1
Simulador E (0,6 g·L ⁻¹)	0	0

Tabela E.2 - Resultados, em UFC, para todas as rolhas em contacto com o simulador alcoólico com 0,1 g·L⁻¹ de E-202 por um período de 10 semanas para o meio de PCA na ausência de condições de assepsia.

Rolha 1								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	2	1	12	12	15	20	10,0														
2	3	1	1	3	0	0	1,0	1	0	2,0	0	0	0	1,0	0	0	0	0	0	0	0,0
4	0	1	2	1	11	16	5,2	0	0	1,0	0	10	12	3,8	0	0	0	0	0	0	0,0
6	4	2	0	0	1	0	1,2	0	0	0,0	0	0	0	0,0	1	0	1	0	0	0	0,3
8	1	2	0	0	1	1	0,8	0	0	0,0	1	1	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0,0
10	44	36	1	1	0	0	13,7	5	3	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	0	0	0,0
Rolha 2								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	5	6	2	1	2	3	3,0														
2	+100	+100	73	79	0	0	38,0	36	37	27	31	32	31	32,0	9	10	3	2	3	4	5,0
4	28	25	22	10	8	4	16,2	5	3	1	4	1	0	2,3	0	0	0	0	0	0	0,0
6	17	11	+100	+100	4	1	8,3	1	2	+100	+100	0	0	1,0	0	0	27	28	0	0	9,2
8	1	2	+100	+100	0	0	0,75	0	1	61	60	0	0	20,3	0	0	11	18	0	0	4,8
10	13	11	+100	+100	8	4	9	0	0	87	88	0	0	29,2	0	0	12	9	1	0	3,7

Rolha 3								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	11	14	7	12	14	14	12,0														
2	98	+100	1	2	0	0	20,0	23	30	0	0	1	0	9,0	3	0	0	0	1	0	1,0
4	+100	+100	53	52	+100	+100	52,5	+100	+100	7	5	58	72	35,5	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100
6	21	32	2	3	2	0	10,0	2	4	1	0	1	0	1,3	2	0	0	0	0	0	0,3
8	1	1	1	3	1	4	1,8	1	0	0	0	1	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0
10	5	7	18	28	35	38	21,8	3	1	3	5	1	4	2,8	1	0	1	0	0	0	0,3
Rolha 4								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	25	18	20	21	17	19	20,0														
2	+100	+100	10	8	0	0	5,0	77	73	0	0	1	0	25,0	19	18	3	0	0	0	7,0
4	19	23	6	2	+100	+100	12,5	5	6	1	0	+100	+100	3,0	1	0	0	0	47	39	14,5
6	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	4	6	37	58	92	86	47,2	0	0	17	11	10	19	9,5
8	36	42	1	0	93	+100	34,4	4	3	31	16	16	16	14,3	1	1	3	5	4	3	2,8
10	46	51	38	39	14	12	33,3	6	8	7	11	0	5	6,2	1	0	1	2	4	4	2

Tabela E.3 - Resultados, em UFC, para todas as rolhas em contacto com o simulador alcoólico com 0,1 g·L⁻¹ de E-202 por um período de 10 semanas para o meio de PCA sob condições de assepsia.

Rolha 1								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados						Média	Triplicados						Média
1	22	22	20	15	20	21	20,0														
2	1	1	1	1	34	24	10,0	2	46	0	1	0	7	9,0	0	0	0	0	1	0	0,0
4	23	27	16	11	1	0	13,0	2	0	2	0	0	0	0,7	0	0	0	0	0	0	0,0
6	0	0	2	1	2	0	0,8	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	0	0,0
8	2	0	5	2	8	9	4,3	0	0	0	0	1	1	0,3	0	0	0	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0	2	1	0,5	0	0	0	0	1	0	0,2	0	0	2	0	0	0	0,3
Rolha 2								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados						Média	Média						Média
1	10	10	20	19	15	14	15,0														
2	0	0	1	0	1	1	1,0	2	7	6	12	6	5	6,0	16	20	4	4	8	8	10,0
4	1	2	88	72	8	4	29,2	0	0	12	13	1	0	4,3	0	0	2	2	1	0	0,8
6	0	0	1	0	17	3	3,5	1	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0,0
8	1	0	0	0	4	0	0,8	0	0	0	0	0	1	0,2	0	0	0	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0	5	15	3,3	0	0	0	0	2	0	0,3	0	0	0	0	1	1	0,3

Rolha 3								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	10	5	7	14	12	9	10														
2	0	0	1	0	1	3	1,0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	0	0,0
4	0	0	79	92	0	0	28,5	2	0	6	11	0	0	3,2	4	4	24	20	10	5	11,2
6	0	0	32	40	0	0	12,0	0	0	9	3	0	0	2,0	0	0	0	0	0	0	0,0
8	30	24	92	73	0	0	36,5	4	8	9	5	0	0	4,3	1	0	1	1	0	0	0,5
10	13	7	69	68	15	11	30,5	2	0	7	5	1	2	2,8	1	2	2	3	3	0	1,8
Rolha 4								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	15	16	13	14	13	14	14,0														
2	8	6	18	15	12	12	12,0	1	0	0	1	1	2	1,0	0	0	1	0	1	0	0,0
4	5	7	55	42	3	3	19,2	1	0	5	5	2	0	2,2	0	0	0	0	0	0	0,0
6	+100	+100	2	3	0	0	1,25	63	51	0	0	2	1	19,5	8	8	0	0	0	0	2,7
8	47	45	23	26	5	4	25,0	6	9	5	0	1	0	3,5	1	0	1	0	0	0	0,3
10	22	32	12	10	3	6	14,2	3	1	1	1	1	1	1,3	1	0	2	3	2	1	1,5

Tabela E.4 - Resultados, em UFC, para todas as rolhas em contacto com o simulador alcoólico com 0,1 g·L⁻¹ de E-202 por um período de 10 semanas para o meio de PDA na ausência das condições de assepsia.

Rolha 1								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	22	22	25	30	10	10	20,0														
2	6	7	6	8	1	0	5,0	1	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	0	0,0
4	26	12	26	38	0	0	17,0	1	1	4	3	34	40	14,0	2	2	1	0	11	1	3,0
6	6	10	11	8	13	13	10,0	0	0	0	0	1	0	0,0	1	0	0	0	0	0	0,0
8	7	2	8	9	1	3	5,0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	0	0,0
10	11	14	1	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	1	0	0,0
Rolha 2								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	1	0	0	0	3	0	1,0														
2	40	48	73	75	33	43	52,0	7	5	15	7	11	4	8,0	1	0	7	0	1	0	2,0
4	3	4	1	5	43	25	14,0	9	16	0	0	0	0	4,0	1	1	1	0	0	0	1,0
6	34	27	+100	+100	11	7	20,0	3	2	+100	+100	2	0	2,0	1	0	27	19	1	0	8,0
8	12	11	+100	+100	7	12	11,0	1	0	58	67	0	0	21,0	0	0	6	13	1	0	3,0
10	14	14	+100	+100	15	8	13	2	0	70	82	2	0	26,0	0	0	15	7	0	1	4,0

Rolha 3								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2							Fator de diluição -3						
	Triplicados						Média	Triplicados						Média	Triplicados						Média
1	+100	+100	3	0	3	0	2,0														
2	68	83	0	0	0	0	25,0	19	15	0	0	1	0	6,0	1	3	0	0	1	0	1,0
4	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	78	61	+100	+100	+100	+100	70,0
6	30	23	8	19	7	10	16,0	4	5	1	2	1	0	2,0	1	0	0	0	0	0	0,0
8	2	4	1	7	10	10	6,0	1	0	0	3	1	1	1,0	0	0	0	0	0	0	0,0
10	8	10	30	30	45	39	27,0	1	3	4	2	4	7	4,0	0	0	2	0	1	0	1,0
Rolha 4								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2							Fator de diluição -3						
	Triplicados						Média	Triplicados						Média	Triplicados						Média
1	+100	+100	0	0	5	5	3,0														
2	+100	+100	6	11	1	0	5,0	58	78	1	0	0	0	23,0	9	12	0	0	0	0	4,0
4	29	48	+100	+100	+100	+100	39,0	5	7	80	96	+100	+100	47,0	0	0	42	34	36	42	26,0
6	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	5	0	93	69	+100	+100	42,0	1	0	10	9	13	19	9,0
8	33	47	+100	+100	93	51	56,0	6	4	18	23	23	27	17,0	3	0	3	4	1	0	2,0
10	51	52	44	35	9	17	35,0	7	9	5	4	2	0	5,0	0	0	2	0	8	0	2,0

Tabela E.5 - Resultados, em UFC, para todas as rolhas em contacto com o simulador alcoólico com 0,1 g·L⁻¹ de E-202 por um período de 10 semanas para o meio de PDA sob condições de assepsia.

Rolha 1								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	22	27	11	11	22	22	19,0														
2	4	+100	45	37	23	15	25,0	0	0	5	5	3	0	2,0	0	1	0	0	0	0	0,0
4	0	0	23	39	17	28	18,0	6	6	2	1	4	3	4,0	1	0	0	0	0	0	0,0
6	1	0	2	5	14	12	6,0	1	1	3	3	2	1	2,0	0	0	1	0	1	0	0,0
8	16	20	9	7	30	26	18,0	1	0	2	1	2	2	1,0	0	0	0	0	1	0	0,0
10	0	1	0	0	0	3	1,0	0	0	0	0	0	1	0,0	0	0	0	1	0	0	0,0
Rolha 2								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -1						Fator de diluição -1							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	10	0	6	6	5	2	5,0														
2	0	0	1	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	2	0,0	0	0	0	0	0	0	0,0
4	11	7	17	8	17	16	13,0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	1	0	0,0
6	9	25	4	6	19	9	12,0	2	2	3	1	1	1	2,0	0	0	0	0	0	0	0,0
8	6	3	14	5	5	7	7,0	2	1	1	0	1	1	1,0	0	0	0	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0	32	32	11,0	1	0	1	1	1	5	2,0	0	0	1	0	1	0	0,0

Rolha 3								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	2	0	1	0	0	0	1,0														
2	0	0	1	1	1	0	1,0	0	0	0	0	1	0	0,0	0	0	0	0	0	0	0,0
4	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100
6	26	18	60	70	19	20	36,0	2	0	11	7	2	3	4,0	1	0	3	0	0	0	1,0
8	53	50	55	79	18	26	47,0	13	8	10	13	4	3	9,0	1	2	1	1	0	0	1,0
10	29	23	71	74	23	15	39,0	0	6	9	8	8	0	5,0	3	1	0	0	1	0	1,0
Rolha 4								Número de UFC													
Tempo de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						Fator de diluição -3							
	Triplicados						Média	Triplicados				Média	Triplicados				Média				
1	0	0	20	18	1	0	7,0														
2	11	18	6	1	1	12	8,0	1	1	0	0	3	1	1,0	0	1	0	0	0	0	0,0
4	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	0	0	89	82	93	80	57,0	18	30	27	24	26	35	27,0
6	+100	+100	28	13	21	18	20,0	54	63	5	4	2	4	22,0	23	18	1	0	0	0	7,0
8	45	51	15	22	5	5	24,0	6	9	0	1	1	0	3,0	0	0	1	0	0	0	0,0
10	27	22	15	7	31	41	24,0	3	2	2	0	0	1	1,0	1	0	2	0	1	1	1,0

Tabela E.6 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico a com 0 g·L⁻¹ no total das 4 semanas em PDA.

Método da gota -PDA	Número de UFC													
Tempos de análise (semanas)	Fator de diluição -2							Fator de diluição -3						
	Triplificados				Média			Triplificados				Média		
1	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	64	55	+100	+100	+100	+100	59,5
2	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	27	22	+100	+100	24	24	24,3
4	+100	+100	21	13	15	18	16,7	36	27	2	1	1	4	11,8

Tabela E.7 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico a com 0,3 g·L⁻¹ no total das 4 semanas em PDA.

Método da gota -PDA	Número de UFC													
Tempos de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						
	Triplificados				Média			Triplificados				Média		
1	3	0	0	0	+100	+100	1	0	0	0	0	3	13	3
2	+100	+100	0	0	28	18	12	+100	+100	0	0	1	2	1
4	67	65	0	0	0	0	22	6	4	0	0	0	0	1,7

Tabela E.8 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico a com 0,6 g·L⁻¹ no total das 4 semanas em PDA.

Método da gota -PDA	Número de UFC													
Tempos de análise (semanas)	Fator de diluição 0							Fator de diluição -1						
	Triplificados				Média			Triplificados				Média		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,17
2	0	1	1	1	0,67	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	+300	0	0,5	0	0	0	0	0	1	0	0	0,2

Tabela E.9 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico a com $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no total das 4 semanas em PCA.

Método da gota -PCA	Número de UFC													
Tempos de análise (semanas)	Fator de diluição -2							Fator de diluição -3						
	Triplificados				Média			Triplificados				Média		
1	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	64	43	+100	+100	+100	+100	53,5
2	+100	+100	+100	+100	99	78	88,5	26	12	+100	+100	4	8	12,5
4	+100	+100	+100	+100	+100	+100	+100	34	0	+100	+100	+100	+100	17

Tabela E.10 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico com $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no total das 4 semanas em PCA.

Método da gota -PCA	Número de UFC													
Tempos de análise (semanas)	Fator de diluição -1							Fator de diluição -2						
	Triplificados				Média			Triplificados				Média		
1	0	0	0	0	66	70	22,7	0	0	2	0	19	26	7,8
2	+100	+100	0	1	19	38	14,5	84	93	0	0	2	0	29,8
4	+100	+100	0	0	0	0	0	+100	+100	1	0	1	0	0,5

Tabela E.11 - Resultados obtidos, em UFC, para o simulador não alcoólico a com $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no total das 4 semanas em PCA.

Método da gota -PCA	Número de UFC													
Tempos de análise (semanas)	Fator de diluição 0							Fator de diluição -1						
	Triplificados				Média			Triplificados				Média		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,17
2	0	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
4	+300	0	+300	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0,3

Apêndice F - Bebidas de controlo

Para a bebida A e B, apresentam-se, na Tabela F.1 e F.2, os valores de UFC contabilizados durante todo o período experimental.

Tabela F.1 - Resultados obtidos, em UFC, para a bebida A ao longo de 10 semanas.

Filtração- PCA		Número de UFC	
Tempo de análise		Fornecedor A	
(semanas)		Rolha 1	Rolha sintética (fornecedor)
Ponto. Zero		0	0
1		4	0
2		3	1
4		15	4
6		10	4
8		160	117
10		297	4

Tabela F.2 -Resultados obtidos, em UFC, para a bebida B ao longo de 10 semanas.

Filtração- PCA		Número de UFC	
Tempo de		Fornecedor B -Rolha 1	
análise(semanas)		Sabor Original	Sabor Gengibre e Yuzu
Ponto. Zero		4	24
1		0	0
2		0	1
4		0	0
6		0	0
8		0	0
10		1	0

A água engarrafada, apresentou logo desde a 1^a semana de análise, um número de colónias de bactérias e fungos muito elevado em ambos os meios de cultura estudados. Esta proliferação é visível na Figura F.1.

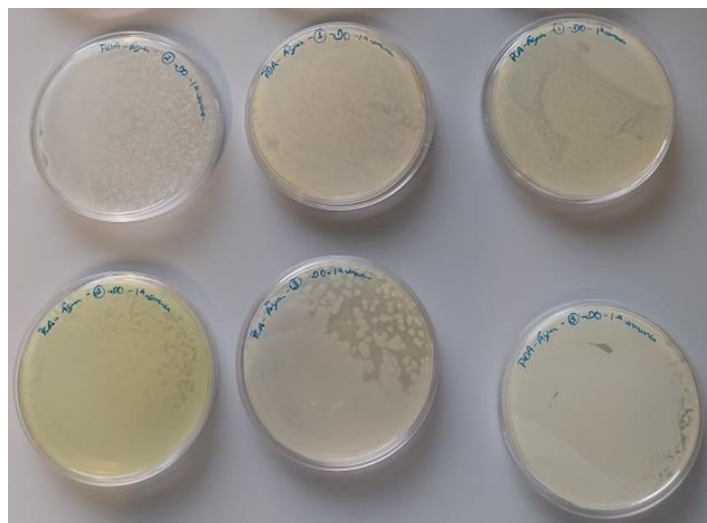


Figura F.1-Resultados obtidos, para PCA e PDA, após uma semana de análise para água engarrafada.

Os resultados obtidos, em número de unidades formadoras de colónias para a solução etanólica a 12% ($v \cdot v^{-1}$) estão representados na Tabela F.3.

Tabela F.3 - Resultados, em número de UFC, da solução etanólica a 12%.

Filtração PCA		Número de UFC		
Tempo de análise (semanas)	Triplicados			Média
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
4	0	0	0	0
6	0	1	1	1
8	4	2	4	3
10	9	11	3	7

Já para a bebida Gordon's quando em contacto com os diferentes tipos de rolhas, obtém os resultados, em UFC, presentes na Tabela F.4.

Tabela F.4 - Resultados obtidos durante 4 semanas para a bebida Gordon's 0,0%, em número de UFC.

Filtração PCA				Número de UFC								
Tipos de Rolhas	1ª semana				2ª semana				4ª semana			
	Triplificados			Média	Triplificados			Média	Triplificados			Média
1	0	1	0	0,3	2	0	7	3,0	1	1	3	1,7
2	0	0	0	0,0	2	3	2	2,3	2	0	2	1,3
3	0	0	1	0,3	6	1	0	2,3	1	0	1	0,7
4	0	0	0	0,0	0	1	1	0,7	36	0	2	12,7

A Tabela F.5 ilustra os resultados obtidos para a rolha microaglomerada com tratamento de PWS e um aditivo antimicrobiano por filtração por vácuo.

Tabela F.5 - Resultados obtidos para a rolha 4 com adição de um antimicrobiano para a bebida Gordon's 0,0%, em número de UFC.

Filtração PCA		Número de UFC			
Tempo de análise (semanas)		Triplificados			Média
0		0	0	0	0
1		3	2	1	2
2		23	118	81	74