



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Sílvia Mariana Vilaça Fernandes

**Estudo do Tempo de Prateleira de Sangria Tinta**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do:

**Professor Doutor José Maria Oliveira**

e do

**Enólogo Manuel Soares**

Outubro 2016

## DECLARAÇÃO

Nome: Silvia Mariana Vilaça Fernandes

Título da dissertação: Estudo do Tempo de Prateleira de Sangria Tinta

Orientadores:

Professor Doutor José Maria Oliveira (Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho)

Enólogo Manuel Soares (Aveleda, SA)

Ano de conclusão: 2016

Designação do Mestrado:

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura:\_\_\_\_\_

*“A persistência é o caminho do êxito.”*

Charles Chaplin



## AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho de dissertação teve o apoio de algumas pessoas, sem as quais seria impossível ultrapassar todas as dificuldades e dúvidas que foram surgindo.

Primeiro gostaria de dar uma palavra especial de agradecimento a todos os professores que me acompanharam ao longo da minha caminhada académica, por toda a disponibilidade e auxílio prestado.

Ao Professor Doutor José Maria Oliveira, orientador deste trabalho, por todo o apoio, sugestões prestadas, disponibilidade e compreensão ao longo do período de execução do estágio, da elaboração desta dissertação e da sua apresentação.

Ao Enólogo Manuel Soares, supervisor na empresa, pelo apoio, orientação, sugestões, dedicação em todo o trabalho e contribuição na execução desta dissertação e acima de tudo, pela oportunidade que me proporcionou de realizar o estágio curricular de conclusão de mestrado na Aveleda, SA.

Aos colaboradores do Departamento de Enologia Carlos Mota, Maria do Carmo dos Santos, Rui Viana e Aurora Ferreira pela minha integração na empresa e a sua disponibilidade para me demonstrarem o funcionamento dos equipamentos e para me ensinarem a realizar os protocolos regentes na Aveleda, SA, incluindo as atividades diárias do laboratório para efeitos de garantia de qualidade dos vinhos.

À Engenheira Susete Rodrigues pelo esclarecimento de dúvidas de temáticas desta dissertação.

Gostaria ainda de agradecer aos colaboradores da adega da Aveleda, SA, Luís, Francisco, Marco, Adão, Miguel, Rui, Carlos, Manuel e João pela formação transmitida sobre vindimas desde a prensagem da uva até ao engarrafamento de vinho e a colaboradores do Departamento de ID, de Marketing, Recursos Humanos, Qualidade, Administração, Enologia, Manutenção e Produção pela disponibilização para a realização das provas sensoriais das sangrias.

Não me poderia esquecer de agradecer aos meus amigos que efetuaram as provas sensoriais triangulares e de preferência de novas formulações de sangria efetuadas no estágio, bem como, aos colaboradores da empresa Ecobite e ao restaurante Casa do Campo em Vila Verde pela oportunidade de realizar as provas de aceitação de sangria com glicosídeos de steviol.

Aos colegas do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Eduardo Coelho e Zlatina Genisheva pelo auxílio prestado a nível de análises de cromatografia gasosa, e ao professor João Peixoto e a outros colegas, que se disponibilizaram para efetuar as provas sensoriais das sangrias.

Ao professor Luís Cunha da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pelo auxílio prestado no tratamento estatístico das análises físico-químicas e sensoriais apresentadas nesta dissertação.

Também gostaria de agradecer aos meus pais e à minha irmã Diana Fernandes por tudo aquilo que me ensinaram a nível pessoal e profissional, desde sempre, e pelo esforço que tiveram para me proporcionar o melhor possível.

Ao meu avô António Vilaça pela preocupação demonstrada acerca da minha integração, estadia em Penafiel e do desenvolvimento deste trabalho.

À Cristiana Lima Fernandes por ter vivido comigo o mestrado, sugestões na execução deste trabalho e por todos aqueles momentos que passamos juntas e que guardarei para sempre no meu coração.

Ao meu namorado, João Vilaça, por todo o apoio e compreensão nos momentos de maior tensão e pelo auxílio prestado na elaboração deste trabalho.

Um eterno agradecimento a toda a gente que tornou possível, mesmo incluindo pequenos gestos, esta dissertação.

## RESUMO

Nos últimos anos têm ocorrido alterações no setor alimentar, despoletadas pelas exigências dos consumidores, estando relacionadas com a garantia da segurança e qualidade alimentar dos produtos adquiridos, em paralelo com a sua facilidade de preparação. O tempo de prateleira é definido como o período entre a produção e o consumo de um produto alimentar, durante o qual este se encontra num estado de qualidade satisfatória, em termos de valor nutricional, de sabor, de textura e de aparência. A sua determinação é um processo habitual na indústria alimentar, podendo ser realizada através de estudos de armazenamento e/ou princípios de cinética química. Os objetivos deste trabalho foram a caracterização físico-química de sangrias comerciais tintas, de forma, a estabelecer comparação com a sangria Casal Garcia, e determinar o tempo de prateleira da mesma através de um ensaio de envelhecimento acelerado.

A primeira parte do trabalho consistiu na caracterização físico-química da sangria Casal Garcia, de sangrias tintas já comercializadas em Portugal e nos EUA e de uma sangria desenvolvida na empresa. A seguinte etapa incluiu a determinação do tempo de prateleira da sangria Casal Garcia através do ensaio de envelhecimento acelerado com diferentes conservantes, avaliando parâmetros de qualidade, quer físico-químicos, quer microbiológicos. O tempo de prateleira foi calculado a partir da equação de Arrhenius em relação ao parâmetro de qualidade, a cor. A seguinte etapa incluiu um controlo de qualidade físico-químico, microbiológico e sensorial de quatro lotes de sangria Casal Garcia, com diferentes tempos de armazenamento. Por último, foram realizadas análises físico-químicas e análises sensoriais, com diferentes tipos de testes de novas formulações de sangria desenvolvidas.

Em relação à caracterização físico-química de sangrias comerciais, verificou-se que 55,6 % dos produtos avaliados possuem o ácido sórbico como conservante. No ensaio de envelhecimento, o DMDC demonstrou ter o maior espectro de ação anti-microbiana. O tempo de prateleira obtido para a sangria Casal Garcia foi de 10 meses e de 28 meses, tendo em conta  $Q_{10}$  e um fator de aceleração, respetivamente, usando a coordenada de cor  $b^*$ , antes de atingir valores positivos, indicativos de cor amarela. No controlo de qualidade dos lotes de sangria de um ano de armazenamento, verificou-se que apesar do teor de  $SO_2$  livre estar abaixo do recomendado, foi suficiente para o controlo microbiano e segurança do produto. Uma sangria com glicosídeos de steviol demonstrou ter um boa aceitabilidade.

## PALAVRAS-CHAVE

Sangria Tinta; Tempo de Prateleira; Conservantes; Caracterização de Sangrias; Controlo de Qualidade



## ABSTRACT

In recent years there have been changes in the food sector, triggered by consumer demand, and being related to ensuring the safety and food quality of the products purchased, in parallel to its ease of preparation. The shelf life is defined as the period between production and consumption of a food product, during which it is in a state of satisfactory quality, in terms of nutritional value, taste, texture and appearance. Determining it is a usual procedure in the food industry, it may be performed through storage studies and/or principles of chemical kinetics. The objectives of this study were the physico-chemical characterization of commercial red sangrias, in order to provide comparison with the Casal Garcia sangria and determine the shelf life of the same through an accelerated aging test.

The first part of the work consisted on the physico-chemical characterization of the Casal Garcia sangria, of red sangrias already marketed in Portugal and in the USA, and of one sangria developed in the company. The next step includes determining the shelf life of the Casal Garcia sangria through accelerated aging test with different preservatives, evaluating quality parameters, whether physical, chemical or microbiological. The shelf life was calculated from the Arrhenius equation regarding the quality parameter, the color. The next step included a physico-chemical quality control, microbiological and sensory four lots of Casal Garcia sangria, with different storage periods. Finally, physico-chemical analysis and sensory analyzes were performed, with different types of sangria developed by new formulations tests.

In relation to the physico-chemical characterization of commercial sangrias, it was found that 55,6 % of the evaluated products have sorbic acid as a preservative. In the aging test the DMDC shown to have the greatest microbial action spectrum. The resulting shelf life of Casal Garcia sangria was of 10 months and 28 months, taking into account  $Q_{10}$  and acceleration factor, using the color coordinate  $b^*$ , before reaching positive values indicating yellow. In the quality control of sangria batch with a year of storage, it was found that despite the free  $SO_2$  content is below the recommended, it was sufficient for microbial control and safety of the product. A sangria with steviol glycosides has shown to have a good acceptability.

## KEYWORDS

Red sangria, shelf-life; preservatives; characterization of sangria; quality control



# ÍNDICE

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de Figuras.....	xv
Índice de Tabelas.....	xvii
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	xxi
1 Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e Objetivos.....	1
1.2 Aveleda, SA.....	3
1.3 Estrutura e organização da dissertação.....	5
2 Revisão Bibliográfica.....	7
2.1 Bebidas aromatizadas à base de vinho.....	7
2.1.1 Sangria.....	8
2.2 Tempo de prateleira de alimentos.....	19
2.2.1 Fatores que afetam o tempo de prateleira.....	19
2.2.2 Métodos de estudo do tempo de prateleira.....	20
2.2.3 Fenómenos de deterioração de vinho.....	25
2.2.4 Conservação de produtos vitivinícolas.....	29
2.3 Controlo de Qualidade de Produtos Vitivinícolas.....	38
2.3.1 Análises Físico-químicas.....	38
2.3.2 Análises Microbiológicas.....	41
2.3.3 Análises Sensoriais.....	41
3 Materiais e Métodos.....	45
3.1 Planeamento experimental.....	45
3.1.1 Caracterização de Sangrias Comerciais.....	47
3.1.2 Ensaio de Envelhecimento Acelerado da Sangria Casal Garcia.....	48
3.1.3 Controlo de Qualidade de Lotes de Sangria Casal Garcia.....	49

3.1.4	Novas Formulações de Sangria .....	50
3.2	Análises físico-químicas .....	51
3.2.1	Preparação da amostra .....	51
3.2.2	Determinação do SO <sub>2</sub> Livre e do SO <sub>2</sub> Total.....	52
3.2.3	Determinação do pH e da Acidez Total.....	54
3.2.4	Determinação da Acidez Volátil .....	54
3.2.5	Determinação de Açúcar Total e de Substâncias Redutoras .....	56
3.2.6	Determinação do teor de Ácido Sórbico.....	58
3.2.7	Determinação do Título Alcoométrico Volúmico e da Massa Volúmica.....	58
3.2.8	Determinação do Extrato Seco Total.....	59
3.2.9	Doseamento dos Compostos Voláteis.....	60
3.2.10	Medição da Cor .....	61
3.2.11	Determinação do Tempo de Prateleira da sangria Casal Garcia .....	63
3.2.12	Determinação da Turbidez.....	63
3.3	Análises Microbiológicas.....	64
3.3.1	Microrganismos Totais.....	64
3.3.2	Leveduras .....	64
3.3.3	Bactérias Acéticas .....	65
3.3.4	Bactérias Lácticas .....	65
3.3.5	Conversão da contagem de colónias para <i>UFC</i> .....	65
3.3.6	Coloração de gram .....	66
3.3.7	Pesquisa da catalase .....	67
3.4	Análises Sensoriais.....	67
3.4.1	Prova Descritiva.....	67
3.4.2	Teste de Preferência.....	68
3.4.3	Teste de Aceitação e de Intenção de Compra .....	68
3.4.4	Teste de Detecção de Diferenças.....	69
3.5	Análise Estatística .....	69
4	Resultados e Discussão .....	71
4.1	Caraterização de Sangrias Comerciais .....	71

4.1.1	Parâmetros físico-químicos .....	71
4.2	Ensaio de Envelhecimento Acelerado de Sangria Casal Garcia .....	78
4.2.1	Parâmetros físico-químicos .....	78
4.2.2	Compostos Voláteis .....	87
4.2.3	Tempo de Prateleira da Sangria Casal Garcia .....	91
4.2.4	Parâmetros microbiológicos .....	93
4.3	Controlo de Qualidade de Lotes de Sangria Casal Garcia .....	99
4.3.1	Parâmetros Físico-químicos .....	99
4.3.2	Parâmetros Microbiológicos .....	101
4.3.3	Caraterização sensorial.....	104
4.4	Novas Formulações de Sangria.....	109
4.4.1	Teste de Preferência por ordenação .....	109
4.4.2	Teste de Aceitação e Intenção de Compra.....	110
4.4.3	Teste de deteção de diferenças.....	112
5	Conclusões e Perspetivas de Trabalho.....	117
	Referências Bibliográficas .....	121
	Anexos .....	133
	Anexo I – Tabelas de auxílio utilizadas para obter valores de parâmetros físico-químicos.....	135
	Anexo II – Fichas de Prova Sensorial Descritiva de lotes de sangria Casal Garcia .....	138
	Anexo III – Ficha de Prova de Aceitação de Sangria com glicosídeos de steviol.....	141
	Anexo IV – Exemplos de Cromatogramas das sangrias do ensaio de envelhecimento.....	142



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Frequência dos hábitos de consumo, semanalmente, e de 3 em 3 meses, de diversos tipos de vinho e de sangria numa amostra de 1200 consumidores (Netsonda <i>consumer channel</i> , 2015). .....	11
Figura 2 – Locais de consumo de diversos tipos de vinho e de sangria e o respetivo tamanho da amostra (Netsonda <i>consumer channel</i> , 2015). .....	12
Figura 3 – Frequência do consumo de sangria tendo em conta o sexo, faixa etária e região de Portugal (Netsonda <i>consumer channel</i> , 2015). .....	12
Figura 4 – Diferença entre a gama de Sangria <i>Mass Market</i> e Sangria <i>Premium</i> (Fieldwork quality, 2015). .....	13
Figura 5 – Fluxograma genérico da produção de vinho branco, tinto e rosado e de sangria (Aveleda, 2015; Hutkins, 2006; Jackson, 2008). .....	18
Figura 6 – Processos de deterioração durante o armazenamento de alimentos (adaptado de Huis in 't Veld, 1996). .....	20
Figura 7 – Degradação do DMDC em contacto com bebidas em função do tempo de hidrólise ( $t$ ) (Adaptado de LanXESS, 2014). .....	35
Figura 8 – Mecanismo de ação do DMDC (LanXess, 2014). .....	35
Figura 9 – Esquema que sintetiza o planeamento experimental no âmbito da presente dissertação. ....	46
Figura 10 – Remoção de dióxido de carbono da sangria através de uma bomba de vácuo. ....	52
Figura 11 – Titulador automático <i>CRISON Matic 23</i> (A) com eléctrodo de $SO_2$ , dedicado à análise de vinhos (B). .....	52
Figura 12 – Amostra de sangria antes (à esquerda) e depois (à direita) da titulação iodométrica. ....	53
Figura 13 – Titulador automático <i>CRISON pH – Matic 23</i> (A) e eléctrodo e dispensador de NaOH (B). ....	54
Figura 14 – A,B - Aparelho de destilação por arrastamento de vapor, constituído por um gerador de vapor, tubo de destilação, dispositivo de retificação e de condensação. ....	55
Figura 15 – Coloração da amostra após as 3 titulações (A – 1. <sup>a</sup> Titulação; B – 2. <sup>a</sup> Titulação; C – 3. <sup>a</sup> Titulação). .....	56
Figura 17 – Coloração da amostra antes da titulação à esquerda e após a titulação à direita. ....	57
Figura 16 – Procedimento de quantificação de açúcares totais: (A – Filtração da amostra depois de estar em contacto com carvão ativado; B – Colocação da amostra em banho-maria; C – Ebulição das amostras). .....	57

Figura 18 – Procedimento de determinação do título alcoométrico volúmico (A - Equipamento de destilação automático; B – Ebulição da sangria com leite de cal e silicone anti-espuma; C - Amostras de sangria no banho 20 °C; D – Densímetro digital). .....	59
Figura 19 – Sala de Provas da Aveleda. ....	67
Figura 20 – Ficha de prova do teste de preferência por ordenação. ....	68
Figura 21 – Estrutura cromática <i>i.e.</i> , distribuição dos pigmentos amarelo, vermelho e azul de sangrias comercializadas em Portugal, EUA e desenvolvida. ....	77
Figura 22 – Evolução da coordenada $b^*$ das sangrias tratadas com sorbato de potássio, ao longo de 124 d a 30 °C (A) e a 40 °C (B). ....	91
Figura 23 – Imagens microscópicas (x1000) de leveduras (A), bactérias acéticas (B) e bactérias lácticas (C). ....	98
Figura 24 – Testes da presença de catalase para auxílio de identificação de bactérias acéticas – catalase positivo (A) e de bactérias lácticas – catalase negativo (B). ....	98
Figura 25 – Pontuação média calculada de (1 a 9) atribuída pelos provadores, para os descritores avaliados nos parâmetros cor, aroma e sabor de lotes de sangria Casal Garcia, com diferentes tempos de armazenamento (396 d, 356 d, 62 d e 31 d). ....	105
Figura 26 – Representação gráfica das duas primeiras componentes principais para os aromas selecionados na prova descritiva dos 4 lotes de sangria Casal Garcia com 396 d, 356 d, 62 d e 31 d de armazenamento. ....	106
Figura 27 – Resultados da apreciação global média ( $A_{gm}$ ) de 4 lotes de sangria de diferentes tempos de armazenamento. ....	108
Figura 28 – Distribuição dos provadores do teste de aceitação relativamente ao género (A) e relativamente à faixa etária (B). ....	110
Figura 29 – Resultados do teste de aceitação ( $A_{stevia}$ ) de sangria com stevia de uma escala hedónica de 9 pontos. ....	111
Figura 30 – Resultados do teste de intenção de compra ( $I_{compra}$ ) da sangria com stevia de uma escala hedónica de 5 pontos. ....	112

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Vinhos, sangria e aguardentes produzidas e/ou comercializados na Aveleda (Aveleda, 2011) .....	4
Tabela 2 – Requisitos legais de diferentes parâmetros para a produção de bebidas aromatizadas à base de vinho [Reg. (UE) n.º251/2014 e Reg. (UE) n.º 1129/2011] .....	10
Tabela 3 – Caracterização geral da Sangria tinta <i>Casal Garcia</i> .....	14
Tabela 4 – Modelos cinéticos e a respetiva aplicação do tipo de deterioração alimentar (Adaptado de Galić <i>et al.</i> , 2009) .....	23
Tabela 5 – Propriedades físico-químicas do ácido benzóico e do benzoato de sódio (WHO, 2000; Weller, 2006) .....	32
Tabela 6 – Propriedades físico-químicas, hidrólise e identificação de produtos da reação de DMDC (EFSA, 2015; OIV, 2013; LanXESS, 2014).....	34
Tabela 7 – Concentração mínima letal ( $C_{letal}$ ) de DMDC para $UFC = 500 \text{ mL}^{-1}$ (Costa <i>et al.</i> , 2008; LanXess, 2009; Ough, 1993a).....	36
Tabela 8 – Ingredientes, título alcoométrico volúmico ( $TAV$ ) e açúcar total ( $AçT$ ) de uma nova formulação de sangria .....	47
Tabela 9 – Formulações de sangria utilizadas num teste de preferência por ordenação .....	50
Tabela 10 – Ingredientes e características das formulações de sangria com MCR e com glicosídeos de steviol que foram utilizadas para o teste triangular .....	51
Tabela 11 – Métodos de cálculo do teor de Açúcar Total ( $AçT$ ) (g/L), tendo em conta $SR$ e diluições efetuadas .....	57
Tabela 12 – Grupo de compostos voláteis que foram quantificados por GC-MS .....	61
Tabela 13 – Testes estatísticos utilizados na análise dos resultados das quatro etapas deste trabalho	69
Tabela 14 – Resultados das análises físico-químicas efetuadas a sangrias comercializadas em Portugal (Marca 1 a 5) e nos EUA (Marca 6 a 9) e da desenvolvida no âmbito deste trabalho. Para cada parâmetro é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado com 95 % de confiança .....	72
Tabela 15 – Intensidade de cor ( $IC$ ) e tonalidade de cor ( $TC$ ) de sangrias comercializadas em Portugal e nos EUA e da desenvolvida no laboratório da Aveleda, SA. Para cada parâmetro é indicado o valor médio de 3 medições da mesma garrafa e o erro associado com 95 % de confiança	76
Tabela 16 – Resultados de análises físico-químicas de sangrias do ensaio de envelhecimento. Cada parâmetro é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança	79

Tabela 17 – Coordenadas de cor de sangrias do ensaio de envelhecimento sem (controlo) e com conservantes (DMDC e SP). Para cada coordenada de cor é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança.....	83
Tabela 18 – Diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) de sangrias do ensaio de envelhecimento com diferentes conservantes à $T_{amb}$ , 30 °C e 40 °C, para diferentes intervalos de tempo ( $\Delta t$ ). Para cada ( $\Delta E^*$ ) é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança .....	86
Tabela 19 – Concentrações médias ( $C$ ) dos compostos voláteis selecionados para avaliação da sua evolução ao longo de 4 meses nas sangrias, a $T_{amb}$ , e respetivo limiar de perceção olfativo ( $LPO$ ). Para cada composto é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança. ....	88
Tabela 20 – Concentrações médias ( $C$ ) dos compostos voláteis selecionados para avaliação da sua evolução ao longo de 4 meses nas sangrias, a 40 °C, e respetivo limiar de perceção olfativo ( $LPO$ ). Para cada composto é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança. ....	89
Tabela 21 – Velocidades de reação ( $k$ ) referentes à coordenada $b^*$ , a 30 °C e 40 °C, e tempo de prateleira ( $t_p$ ) da sangria Casal Garcia obtido a partir do $Q_{10}$ e do fator de aceleração ( $FA$ ), a 20 °C.....	92
Tabela 22 – Resultados das análises microbiológicas, de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, aos ingredientes utilizados na formulação da sangria para o ensaio de envelhecimento.....	93
Tabela 23 – Resultados das análises microbiológicas, de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, a sangrias com diferentes conservantes, ao longo dos 124 d de envelhecimento .....	95
Tabela 24 – Resultados das análises microbiológicas, de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, a sangrias tratadas com benzoato de potássio e com benzoato de sódio (análises adicionais) .....	97
Tabela 25 – Resultados das análises físico-químicas realizadas aos 4 lotes de sangria distintos de diferentes tempos de armazenamento. Para cada parâmetro é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança.....	100
Tabela 26 – Resultados da concentração de $SO_2$ livre ( $C_{SO_2 \text{ livre}}$ ) de dois lotes de sangria no momento do engarrafamento e 396 d e 356 d depois. Para cada composto é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança.....	101

Tabela 27 – Resultados das análises microbiológicas de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, a sangrias com sorbato de potássio produzidas e filtradas a 0,22 µm e 0,45 µm em laboratório.....	102
Tabela 28 – Resultados das análises microbiológicas de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, a uma sangria com 582 d.....	102
Tabela 29 – Resultados das análises microbiológicas de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, a lotes de sangria engarrafadas com cerca de 1 ano .....	103
Tabela 30 – Resultados do teste de preferência por ordenação de 4 lotes de sangria com diferentes tempos de armazenamento.....	108
Tabela 31 – Resultados do teste de preferência por ordenação crescente de 5 formulações de sangria .....	109
Tabela 32 – Resultados das análises físico-químicas de sangria não pasteurizada e pasteurizada ....	114



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

### Variáveis

$\rho$  – Massa Volúmica aparente

$\rho_{20\text{ }^{\circ}\text{C}}$  – Massa Volúmica a 20 °C

$a^*$  – Coordenada de cor (verde/vermelho) ( $-a^*$  indica verde e  $+a^*$  indica vermelho)

$Abs$  – Absorvância

$A_{\zeta T}$  – Concentração mássica de açúcar total

$A_{\text{global}}$  – Apreciação global de sangrias

$A_{\text{gm}}$  – Apreciação global média de sangrias

$A_{\text{stevia}}$  – Aceitação de sangrias com glicosídeos de steviol

$AS$  – Concentração mássica de ácido sórbico

$AT$  – Acidez Total, expressa em ácido tartárico

$AV$  – Acidez Volátil, expressa em ácido acético

$b^*$  – Coordenada de cor (azul/amarelo) ( $-b^*$  indica azul e  $+b^*$  indica amarelo)

$C^*$  – Saturação de cor

$C$  – Concentração média

$C_{\text{letal}}$  – Concentração mínima letal

$C_{\text{SO}_2 \text{ livre}}$  – Concentração mássica de dióxido de enxofre livre

$C_{\text{SO}_2 \text{ total}}$  – Concentração mássica de dióxido de enxofre total

$E_a$  – Energia de Ativação

$EST$  – Extrato seco total

$FA$  – Fator de aceleração

$FCR$  – Força Centrífuga Relativa

$\text{FTIR}_{\text{SR}}$  – Sinal do FTIR para a leitura das substâncias redutoras

$\text{FTIR}_{\text{AV}}$  – Sinal do FTIR para a leitura do título alcoométrico volúmico

$H^*$  – Tonalidade

$IC$  – Intensidade de Cor

$I_{\text{compra}}$  – Intenção de compra

$k$  – Constante de velocidade de uma reação

$k_0$  – Fator de pré-exponencial

$L^*$  – Luminosidade, varia entre 0 (escuro) e 100 (claro)

$LPO$  – Limiar de Percepção Olfativo

$Q$  – Atributo de qualidade  
 $Q_0$  – Valor inicial do atributo de qualidade  
 $Q_{10}$  – proporção entre a velocidade de reação ( $k$ ) a uma determinada temperatura, em relação a uma temperatura inferior 10 °C  
 $R$  – Constante universal dos gases  
 $SR$  – Concentração mássica de substâncias redutoras  
 $SR_m$  – Massa de substâncias redutoras  
 $TAV$  – Título Alcoométrico Volúmico  
 $TC$  – Tonalidade de cor  
 $t_p$  – Tempo de prateleira  
 $T_{amb}$  – Temperatura à volta de 20 °C  
 $T_u$  – Temperatura de utilização do produto  
 $t_a$  – Tempo de prateleira para o teste acelerado  
 $t_u$  – Tempo de uso  
 $UFC$  – Unidades Formadoras de Colónias  
 $UP$  – Unidades de Pasteurização  
 $\Delta V$  – Variação de volume inicial e gasto em titulação

#### Abreviaturas e siglas

BP – Benzoato de Potássio  
BS – Benzoato de Sódio  
CIELab – Espaço de cores definido pela Comissão Internacional de Iluminação  
DMDC – Dicarbonato de dimetilo  
FTIR – *Fourier Transform InfraRed Spectroscopy* (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)  
GC-MS – *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa)  
MCR – Mosto Concentrado Retificado  
*q.b.* – quanto baste  
SP – Sorbato de Potássio

Expressões do latim

*et al.* – E outros, do latim *et alli*

*i.e.* – Isto é, do latim *id est*



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Enquadramento e Objetivos

Os consumidores estão cada vez mais exigentes de forma consistente, na procura da elevada qualidade dos alimentos e possuem expectativas que ela seja mantida a um nível elevado durante o período entre a compra e o consumo. Estas expectativas são consequência não apenas da exigência principal que o alimento deve permanecer seguro, mas também da necessidade de minimizar as alterações indesejáveis na qualidade sensorial (Kilcast e Subramaniam, 2000). As características sensoriais aceitáveis são, muitas vezes definidas pela política da indústria, mas, no entanto, é importante entender como essas mudanças ocorrem no armazenamento. Por isso, torna-se importante usar esses dados para ajudar a definir o prazo de validade/tempo de prateleira/tempo de vida útil.

Segundo o *Institute of Food Science & Technology* (1993) o prazo de validade define-se como o tempo durante o qual o produto alimentar permanece seguro, mantém as características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas e cumpre qualquer declaração de dados nutricionais presentes no rótulo quando armazenado sob as condições recomendadas. Na indústria alimentar, o lançamento de novos produtos deve ser, idealmente, breve. No entanto, isto é viável para produtos de curto prazo de validade. Em relação a produtos com longo tempo de prateleira, é necessário conhecer as características de qualidade ao longo do período de vida útil prevista, o que pode introduzir atrasos inaceitáveis. Consequentemente, os procedimentos acelerados de tempo de prateleira são muitas vezes utilizados a fim de contornar este problema (Kilcast e Subramaniam, 2000).

A perda de qualidade dos alimentos é devida a várias reações ou processos que possam ter ocorrido, nomeadamente químicos, enzimáticos, microbiológicos e físicos. Estes processos indesejáveis podem ser minimizados ou mesmo eliminados, utilizando diversas metodologias, tais como a formulação, o processamento, a embalagem e a utilização de aditivos, a fim de preservar a qualidade de um produto alimentar (Gould e Russell, 2003). Os aditivos alimentares ou conservantes, especialmente os naturais, têm sido utilizados desde séculos. O dióxido de enxofre foi empregado como conservante por Assírios, Gregos e Chineses e muito mais tarde foi usado para preservação do vinho em toda a Europa. No entanto, os produtos químicos sintéticos foram usados primeiramente como conservantes de alimentos no início do século XX (Shibamoto e Bjeldanes, 2009).

A sangria é uma bebida aromatizada à base de vinho e é associada à elaboração tradicional, onde a sua qualidade final resulta da origem e qualidade dos ingredientes selecionados, nomeadamente o tipo

de vinho, as frutas e a mistura e qualidade dos licores utilizados. No caso do vinho, que é o principal ingrediente da sangria, as principais alterações químicas negativas, que afetam o tempo de prateleira, são a oxidação, a hidrólise de ésteres e, porventura, o aparecimento de *off-flavours*. Inicialmente, a maioria das modificações melhoram as suas características sensoriais. Posteriormente, as mudanças do aroma varietal e de fermentação bem como da cor modificam progressivamente os seus atributos originais. Essas alterações podem ou não ser vistas como desejáveis (Jackson, 2011).

A adição de conservantes ao vinho, em particular o sorbato de potássio, em simultâneo com o aumento do pH associado à descarboxilação do ácido málico é, particularmente, um problema quando esse conservante é adicionado para controlar leveduras indesejáveis em vinhos doces. O metabolismo do ácido sórbico, que está presente no sal de sorbato de potássio, por bactérias lácticas resulta na formação de 2-etoxi-3,5-hexadieno, um composto que proporciona um forte odor semelhante a gerânio (sardinheira), que é indesejável nos vinhos (Jackson, 2008). Durante a conservação ou o envelhecimento do vinho, os microrganismos, tais como bactérias dos géneros *Acetobacter*, *Lactobacillus* e *Pediococcus* e a levedura do género *Brettanomyces* podem crescer e causar deterioração. O impedimento do desenvolvimento destes microrganismos pode ser conseguido através da utilização de tratamentos químicos, físicos e térmicos (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). O conservante químico mais comumente utilizado em vinhos é o dióxido de enxofre, mas, atualmente, há uma tendência para reduzir os seus teores.

O estágio curricular que conduziu a este trabalho de Dissertação foi realizado na empresa Aveleda, SA. No âmbito deste trabalho, pretendeu-se primeiramente, avaliar sangrias tintas presentes no mercado em Portugal e nos Estados Unidos da América, de forma a comparar parâmetros de qualidade físico-química com a sangria já produzida na Aveleda, SA, correspondente à Casal Garcia Sangria. Um outro objetivo foi estimular o tempo de prateleira da sangria Casal Garcia, utilizando um ensaio de envelhecimento acelerado com o fator temperatura durante 4 meses. Tencionou-se também neste ensaio testar o efeito de diferentes conservantes em sangria. Por último, um outro objetivo seria a caracterização físico-química e sensorial de formulações de sangria com variação/quantidade de ingredientes, nomeadamente edulcorantes, especiarias e aromas.

## 1.2 Aveleda, SA

Na Aveleda, SA, os primeiros registos de venda de vinho engarrafado datam de 1870, pela mão de Manuel Pedro Guedes (1837 a 1899). Hoje a empresa continua a pertencer em pleno à família Guedes, sempre empenhada em manter este legado familiar que já passou por várias gerações. Atualmente a Aveleda, SA é gerida pela 4.<sup>a</sup> e 5.<sup>a</sup> gerações da família Guedes e conta com 124 trabalhadores (Aveleda, 2011).

O grupo Aveleda, SA é constituído pela Holding Fernando & Irmãos SGPS, SA que detém a Aveleda, SA (dedicada à produção de vinhos e queijos) e o Zoo de Santo Inácio – Empreendimentos Turísticos, Lda.

Nas décadas de 60 e 70 do século XX, a Aveleda, SA operou uma relevante alteração na cadeia de produção, através da instalação e melhoria de vários equipamentos, entre os quais se salientam o centro de vinificação, a adega das figueiras, um salão de engarrafamento, um alambique para destilação de aguardente vínica e a constituição dos primeiros *stocks* de “Adega Velha” para envelhecimento. Tais investimentos trouxeram um significativo aumento de capacidade e qualidade da produção de vinhos (Aveleda, 2011).

A Aveleda, SA, daqui em diante designada apenas por Aveleda, possui 205 ha de vinhas, das quais, 184 ha se encontram no epicentro da Região Demarcada dos Vinhos Verdes. Os outros 21 ha situam-se na Quinta da Agueira localizada na Região da Bairrada (Valongo do Vouga) (Aveleda, 2011). A Quinta da Aveleda e a Quinta da Agueira, constituem os dois centros de vinificação da Aveleda. Recentemente, a empresa investiu numa quinta na região de Torre de Moncorvo, designada de 6 Quintas.

Atualmente, a Aveleda está entre as três maiores empresas vitivinícolas nacionais, sendo o maior produtor de Vinho Verde, de reconhecido mérito nacional e internacional, com uma capacidade produtiva anual de cerca de 18 milhões de garrafas e um volume de vendas na ordem dos 30 milhões de euros, exportando para aproximadamente 70 países, cerca de 70 % da sua produção. Uma das marcas de Vinho Verde que mais vende em todo o mundo, e é produzida na Aveleda, é a Casal Garcia. O Casal Garcia nasceu em 1939, num ano em que a vindima foi particularmente boa. O nome é proveniente do nome de uma das vinhas da Aveleda de onde surgiu o vinho naquela altura (Aveleda, 2011). A gama de vinhos Casal Garcia, tem de momento, um produto novo, nomeadamente uma Sangria Tinta. Na Tabela 1 encontra-se a lista de produtos produzidos e comercializados na Aveleda.

Tabela 1 – Vinhos, sangria e aguardentes produzidas e/ou comercializadas na Aveleda (Aveleda, 2011)

Vinhos	
<p><b>Casal Garcia</b></p> 	<p>Casal Garcia Vinho Verde Branco</p> <p>Casal Garcia Vinho Verde Rosé</p> <p>Casal Garcia Vinho Verde <i>Sweet</i></p> <p>Casal Garcia Douro Tinto</p> <p>Casal Garcia Espumante Vinho Verde Branco</p> <p>Casal Garcia Espumante Vinho Verde Rosé</p> <p>Casal Garcia Sangria Tinta</p>
<p><b>Aveleda</b></p> 	<p>Aveleda Vinho Verde</p> <p>Aveleda Douro Branco</p> <p>Quinta da Aveleda</p> <p>Aveleda Alvarinho</p> <p>Aveleda Reserva da Família Bairrada</p> <p>Aveleda Reserva da Família Alvarinho</p>
<p><b>Charamba</b> (Douro)</p> 	<p>Charamba Tinto</p> <p>Charamba Tinto Reserva</p>
<p><b>Follies</b> (Bairrada)</p> 	<p>Aveleda Follies Touriga Nacional   Cabernet Sauvignon</p> <p>Aveleda Follies Touriga Nacional</p> <p>Grande Follies Tinto</p>
<p><b>Aguardentes</b></p> 	<p>Adelha Velha 6, 12 e 30 anos</p>

A Aveleda utiliza um moderno centro de engarrafamento, situado em Penafiel, com uma capacidade anual de engarrafamento de 15 a 20 milhões de garrafas, que cumpre com o sistema de gestão de segurança alimentar (HACCP) e é certificada pela ISO 22000. Além dessa certificação, a Aveleda é certificada nas ISO 9001 (Qualidade), ISO 14001 (Ambiente) e ISO 50001 (Energia).

A Aveleda possui ainda uma queijaria que surgiu em 1988, e produz queijos amanteigados de vaca e cabra, incluindo os de mistura, curados, fumados e de sabor intenso (Aveleda, 2011).

### 1.3 Estrutura e organização da dissertação

Esta dissertação está dividida em 5 capítulos, orientados no sentido de apresentar o trabalho desenvolvido ao longo do estágio curricular de conclusão de mestrado.

No primeiro, introdução, está presente um enquadramento ao tema da dissertação, as principais características da Aveleda, onde foi desenvolvido o estágio, os principais objetivos pretendidos com o mesmo, bem como o modo como esta tese foi organizada.

O capítulo 2 inclui uma revisão bibliográfica de suporte ao tema desta tese, incluindo uma abordagem geral das bebidas aromatizadas à base de vinho, nas quais a sangria se insere, e as suas propriedades e ingredientes. Além disso, é descrito, de forma breve, o processo de produção de vinho e, posteriormente, da sangria. Relativamente ao tema fulcral deste trabalho, estudo do tempo de prateleira de sangria tinta, são referidos os fatores que o afetam, os métodos de estudo, os fenómenos de deterioração de vinho e as formas de os regredir, referindo ainda métodos de conservação e parâmetros de controlo de qualidade de produtos vitivinícolas.

No capítulo 3 encontram-se os materiais e as metodologias utilizadas para concretizar os objetivos do trabalho.

O capítulo 4 é constituído pelos resultados obtidos e pela sua discussão. Por questões organizativas, entendeu-se dividir este capítulo em quatro subcapítulos.

O primeiro refere-se aos resultados obtidos da caracterização físico-química da Casal Garcia Sangria, de sangrias comercializadas em Portugal e nos Estados Unidos da América e de uma sangria desenvolvida no âmbito deste trabalho.

No segundo estão presentes os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas da sangria Casal Garcia com diferentes conservantes e a determinação do seu tempo de prateleira, a partir de um envelhecimento acelerado.

O terceiro apresenta resultados do controlo de qualidade físico-química, microbiológica e sensorial de quatro lotes de sangria Casal Garcia com 396 d, 356 d, 62 d e 31 d de armazenamento. O último apresenta os resultados de análises sensoriais e físico-químicas de novas formulações de sangria e de sangria pasteurizada.

O quinto e último capítulo apresenta as conclusões mais importantes e as sugestões para trabalhos futuros neste domínio.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo visa fornecer um conjunto de conceitos e informação de suporte ao tema desta dissertação.

Resumidamente, este capítulo inclui uma abordagem geral das bebidas aromatizadas à base de vinho, nas quais a sangria se insere, e as suas propriedades e ingredientes. É descrito, de forma breve, o processo de produção de vinho e, posteriormente, de sangria. Em relação ao estudo do tempo de prateleira de sangria tinta, são referidos os fatores que o afetam, os métodos de estudo, os fenómenos de deterioração, os métodos de conservação e parâmetros de controlo de qualidade de produtos vitivinícolas.

### 2.1 Bebidas aromatizadas à base de vinho

As bebidas podem ser divididas em dois grandes grupos, distinguindo-se pela presença ou não de álcool na sua composição. O teor alcoólico volúmico adquirido das que apresentam álcool pode variar entre 3 % e 40 %. Nos níveis inferiores encontram-se as cervejas e os vinhos de mesa, nos intermédios estão os vinhos fortificados e licorosos e, nos superiores, os licores e as bebidas destiladas. Como exemplos de bebidas não alcoólicas, encontram-se os sumos de fruta e as respetivas diluições (néctares, bebidas de frutas e sumos tropicais), os refrigerantes, os refrescos, etc. (Marzarotto e Barnabé, 2013).

As bebidas alcoólicas são produtos alimentares com propriedades organoléticas específicas. Mundialmente, podem ser categorizadas com base em variáveis como ingredientes da fermentação, técnicas de processamento, componentes de mistura, edulcorantes, níveis de álcool e hábitos de consumo da seguinte forma: bebidas destiladas genéricas, licores/tónicos, vinhos/bebidas alcoólicas à base de vinho, cerveja/bebidas alcoólicas à base de malte e de cerveja e coquetéis/bebidas alcoólicas à base de bebidas espirituosas (Zach, 2007).

Devido à estagnação do consumo de vinho, a procura pela variabilidade de produtos e a vontade dos consumidores em experimentar novos sabores levou ao estabelecimento de novas formulações, nomeadamente, bebidas à base de vinho. Além disso, tem ocorrido um aumento da atratividade deste tipo de bebidas para os produtores, visto conterem um título alcoométrico volúmico adquirido entre 4,5 % e 12 % [Zach, 2007; Reg. (UE) n.º 251/2014].

A bebida aromatizada à base de vinho é uma bebida que é obtida a partir de um ou mais dos produtos vitivinícolas definidos no Anexo VII, parte II, pontos 1, 2 e 4 a 9, do Reg. (UE) n.º 1308/2013, com a exceção dos vinhos produzidos com adição de álcool e o vinho Retsina, vinho espumante natural, vinho espumante de qualidade, vinho espumante de qualidade aromática, vinho espumante gaseificado, vinho frizante natural e vinho frizante gaseificado. Os produtos vitivinícolas representam, pelo menos, 50 % do volume total da bebida aromatizada. Além disso, as bebidas aromatizadas à base de vinho são bebidas às quais não é adicionado álcool, salvo indicação em contrário (Anexo II), às quais foram eventualmente adicionados corantes, mosto de uvas, mosto de uvas parcialmente fermentado ou ambos, que podem ter sido eventualmente edulcoradas e com um título alcoométrico volúmico adquirido igual ou superior a 4,5 % e inferior a 14,5 % [Reg. (UE) n.º 251/2014].

### 2.1.1 Sangria

Desde as suas humildes raízes em Espanha, a sangria tornou-se uma bebida de festa popular e refrescante por todo o mundo (Shea, 2012).

Em 1964, a sangria foi pela primeira vez degustada na Feira Mundial nos Estados Unidos, mais concretamente em Nova Iorque. A área do Mundo Espanhol serviu este ponche de vinho frutado aos seus visitantes e foi feita história (Shea, 2012)!

Olhando mais concretamente para Espanha, esta região foi plantada ativamente com vinhas pelos Romanos quando eles invadiram a região por volta de 200 a.C. Havia um comércio marítimo de vinho muito ativo entre Espanha e Roma. As uvas tintas cresciam muito bem nesse local e foram disfrutadas desde então. Os locais chamaram aos seus ponches de vinho, em todas as suas variedades, *sangria* (Shea, 2012).

A sangria é baseada no ponche tradicional de vinho tinto, popular em toda a Europa há centenas de anos. A base do ponche é *claret*. *Claret* é o termo britânico para o vinho de Bordeaux, França. Este vinho tinto é tradicionalmente feito a partir de uma mistura de *Cabernet sauvignon*, *Cabernet franc* e *Merlot*. O *Brandy* e fruta seriam acrescentados ao ponche de vinho tinto para dar sabor (Shea, 2012).

Recuando ainda mais no tempo, *hippocras* é uma bebida de mistura bem documentada e apreciada na Idade Média. Era tradicionalmente um vinho com várias especiarias adicionadas, nomeadamente, gengibre, canela, entre outros (Shea, 2012).

Porquê a ênfase ao vinho em vez de outra bebida? Naquele tempo a água era frequentemente imprópria para consumo. As pessoas preferiam tomar banho nela, lavar os seus cavalos, entre outros.

O leite era considerado apenas um alimento para bebés. Isso significava, até para as crianças, que o único líquido seguro para beber tinha algum álcool adicionado. O álcool impediria o crescimento de qualquer bactéria presente na bebida. A maioria das famílias fazia algum vinho a partir de frutas e bagas locais. Era muito natural personalizar a bebida, adicionando mais especiarias, frutas e outros itens ao vinho para dar um sabor diferente (Shea, 2012).

Segundo o Reg. (UE) n.º 251/2014, “a sangria é obtida a partir de vinho, aromatizada através da adição de essências ou extratos naturais de citrinos, com ou sem sumo desses frutos, à qual foram eventualmente adicionadas especiarias e dióxido de carbono e que não foi corada”. Deve ter um título alcoométrico volúmico adquirido igual ou superior a 4,5 % e inferior a 12 %, pode conter partículas sólidas provenientes da polpa ou da casca de citrinos e cuja cor deve resultar exclusivamente das matérias-primas utilizadas.

#### 2.1.1.1 Enquadramento legislativo

“A designação «sangria» ou «sangria» só pode ser utilizada como denominação de venda quando o produto for produzido em Espanha ou em Portugal, respetivamente. Se o produto for produzido noutros Estados-Membros, a designação «sangria» ou «sangria» só pode ser utilizada em complemento da denominação de venda «bebida aromatizada à base de vinho», desde que seja acompanhada da menção: «produzido em...», seguida do nome do Estado-Membro produtor ou de uma região mais restrita” [Reg. (UE) n.º 251/2014].

Na Tabela 2 são apresentados os requisitos e restrições técnicas para a produção de bebidas aromatizadas à base de vinho tendo em conta o Reg. (UE) n.º 251/2014, relativo à definição, descrição, apresentação, rotulagem e proteção das indicações geográficas dos produtos vitivinícolas aromatizados, e o Reg. (UE) n.º 1129/2011, relativo a aditivos alimentares.

Em termos de rotulagem das bebidas espirituosas e produtos vînicos aromatizados, o Reg. (UE) n.º 1169/2011 exige a indicação dos ingredientes alergénicos, concretamente, dióxido de enxofre/sulfitos, ovos e produtos à base de ovos e leite e produtos à base de leite. Para estas bebidas, também-se torna obrigatório a referência de denominação do produto, a indicação dos ingredientes alergénicos, a indicação de proveniência e a identificação do engarrafador. Posto isto, não é referida a obrigatoriedade na rotulagem da informação acerca do prazo de validade de produtos vitivinícolas aromatizados.

Tabela 2 – Requisitos legais de diferentes parâmetros para a produção de bebidas aromatizadas à base de vinho [Reg. (UE) n.º 251/2014 e Reg. (UE) n.º 1129/2011]

Legislação relativa a ingredientes de bebidas aromatizadas à base de vinho	
<b>Produtos Vitivinícolas</b>	Mínimo 50 %
<b>Aromatização</b>	Com ou sem sumo de fruta no caso da sangria; As substâncias aromatizantes e/ou as preparações aromatizantes definidas no artigo n.º 3, n.º 2 alíneas b) e d), do Reg. (UE) n.º 1334/2008, e ii) ervas aromáticas e/ou especiarias e/ou géneros alimentícios sápidos. A adição de tais substâncias confere ao produto final características organoléticas diferentes das de um vinho.
<b>Açúcares</b>	Açúcar semi-branco, açúcar branco, açúcar branco extra, dextrose, frutos e, xarope de glucose, açúcar líquido, açúcar líquido invertido e xarope de açúcar invertido, mosto de uvas, mosto de uvas concentrado e mosto de uvas concentrado retificado, açúcar caramelizado, obtido exclusivamente por aquecimento controlado da sacarose, sem adição de bases, ácidos minerais ou qualquer outro aditivo químico, mel, xarope de alfarroba e quaisquer outras substâncias glucídicas naturais com efeito análogo ao dos produtos referidos.
<b>Adição de Alcool</b>	a) Alcool etílico de origem agrícola, na aceção do Anexo I, ponto 1, do Reg. (UE) n.º 110/2008, incluindo de origem vitivinícola; b) Alcool de vinho ou de uvas secas; c) Destilado de vinho ou de uvas secas; d) Destilado de origem agrícola, na aceção do Anexo I, ponto 2, do Reg. (UE) n.º 110/2008; e) Aguardente de vinho, na aceção do Anexo II, ponto 4, do Reg. (UE) n.º 110/2008; f) Aguardente bagaceira, na aceção do Anexo II, ponto 6, do Reg. (UE) n.º 110/2008; g) Bebidas espirituosas destiladas de uvas secas fermentadas.
<b>Adição de Água</b>	É autorizada a adição de água para: – a preparação dos extratos aromatizantes; – a dissolução dos corantes e edulcorantes; – o ajuste da composição final do produto. A qualidade da água adicionada deve respeitar os requisitos da Diretiva 2009/54/CE do Parlamento Europeu e da Diretiva 98/83/CE e não poderá modificar a natureza do produto. Pode ser utilizada água destilada, desmineralizada, resultante de processos de permuta iónica ou amaciada.
<b>Aditivos</b>	As regras relativas aos aditivos alimentares, incluindo os corantes, estabelecidas no Reg. (UE) n.º 1333/2008 aplicam-se aos produtos vitivinícolas aromatizados. Não se podem usar corantes no caso da sangria.  <b>Conservantes:</b> E 200 – 203 Ácido Sórbico-Sorbatos (Máx. 200 mg/L) E 242 DMDC (Dicarbonato de Dimetilo) (Máx. 250 mg/L) E220 Dióxido de Enxofre (Máx. 300 mg/L)  <b>Acidificantes:</b> E 338 – 452 Ácido fosfórico – fosfatos – di, tri e polifosfatos (Máx. 1 000 mg/L)  <b>Emulsionantes e estabilizadores:</b> E 473 – 474 Ésteres de sacarose de ácidos gordos – sacaroglicéridos (Máx. 5 000 mg/L)
<b>CO<sub>2</sub></b>	Permitida a presença

### 2.1.1.2 Estudo de mercado

No ano de 2013, em França verificou-se uma subida no consumo de bebidas aromatizadas à base de vinho, e de sangria, em cerca de 45,2 %, em relação ao ano anterior. Esta subida foi significativa em relação ao consumo de outras bebidas, nomeadamente rum, cervejas especiais, conhaque e chás

gelados, de acordo com um estudo realizado pela revista francesa *RayonBoissons*. Como vantagens, estas bebidas têm menor teor alcoólico, são fáceis de beber e têm tendência para serem utilizadas como aperitivos por jovens entre os 18 e os 34 anos (*Los Angeles times*, 2014). Em França, no ano de 2013, um vinho rosé aromatizado foi um dos produtos que mais cresceu em termos de vendas. A partir desse momento, este produto foi considerado a “ponta do iceberg” e o estímulo para o desenvolvimento de novos produtos desta gama (*Wine intelligent*, 2014).

Nesse mesmo ano de 2013 surgiu uma lei que foi referida no ponto 2.1.1.1, que fornece uma vantagem mais competitiva para Portugal e Espanha. Isto porque, em termos de rotulagem, só se designa de Sangria a bebida que for produzida exclusivamente nesses dois países, ou seja, da Península Ibérica.

Um outro país, onde foi notório o crescimento do consumo de Sangria foi nos EUA. As quatro principais marcas de sangria cresceram em volume de vendas 43 %, entre 2010 e 2013 de acordo com *Impact Databank*. Uma das marcas cresceu em volume de vendas 206 % desde 2010 (*Shanken news daily*, 2014).

Em 2015 o grupo Netsonda *consumer channel*, elaborou um estudo em Portugal que resultou de 1200 entrevistas em todas as regiões do país, mais concretamente, 38 % (Lisboa + Setúbal), 27 % (Norte), 21 % (Centro) e 14 % (Sul). A amostra era constituída por 51 % de pessoas do sexo masculino e 49 % do sexo feminino. A distribuição das idades foi 16 % (18 anos a 24 anos), 24 % (25 anos a 34 anos), 30 % (35 anos a 44 anos) e 30 % (45 anos a 55 anos). Na Figura 1 encontra-se representada a frequência e os hábitos de consumo dos inquiridos em diversas bebidas alcoólicas, nomeadamente, diversos tipos de vinho, sangria e aguardente.

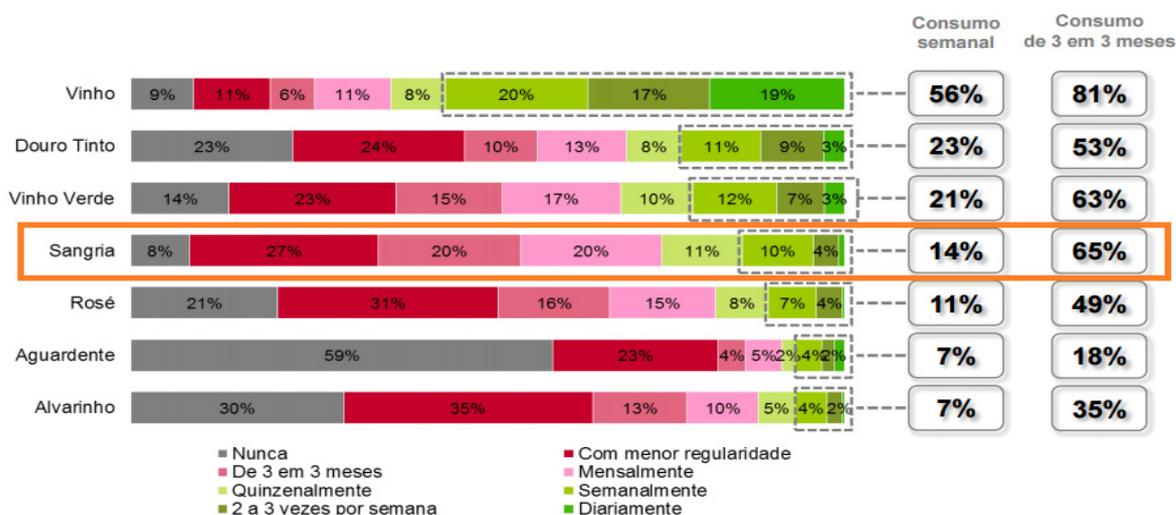


Figura 1 – Frequência dos hábitos de consumo, semanalmente, e de 3 em 3 meses, de diversos tipos de vinho e de sangria numa amostra de 1200 consumidores (Netsonda *consumer channel*, 2015).

Através da Figura 1 é possível verificar que a sangria é uma bebida de consumo de menor regularidade, o que pode ser explicado pelo facto de ser uma bebida predileta em festas populares/festivais, bem como em bares/esplanadas, o que está evidente na Figura 2. Pode-se ainda verificar que 65 % da amostra consome sangria de 3 em 3 meses e 14 % consome semanalmente.

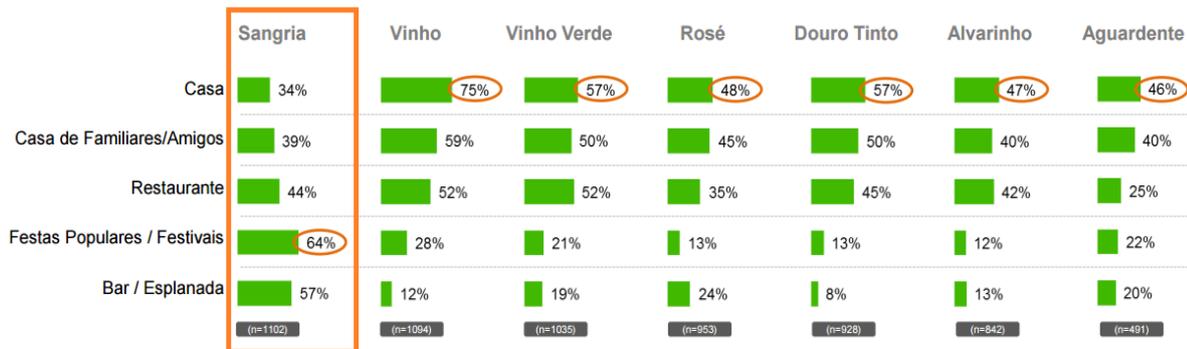


Figura 2 – Locais de consumo de diversos tipos de vinho e de sangria e o respetivo tamanho da amostra (Netsonda *consumer channel*, 2015).

Em termos de faixas etárias e regionais, verificou-se nesse estudo, que o consumo mais regular de sangria é feito principalmente pelo *target* mais jovem (18 a 24 anos), com maior predominância nas regiões de Lisboa/Setúbal e menos nas regiões do Norte do país, o que está presente na Figura 3. Notou-se ainda uma marca líder na categoria. Destacou-se também a relevância do consumo de sangrias “caseiras”, isto é preparadas em casa.

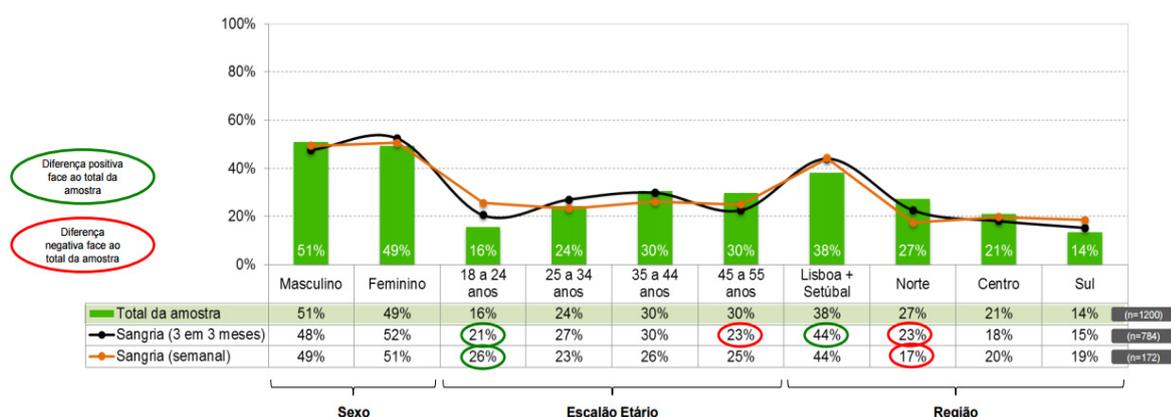


Figura 3 – Frequência do consumo de sangria tendo em conta o sexo, faixa etária e região de Portugal (Netsonda *consumer channel*, 2015).

Num outro estudo realizado pela *Fieldwork quality* (2015), verificou-se que de uma forma geral, a eleição no consumo de bebidas de forma espontânea passa pelos produtos mais jovens e modernos,

tais como a cerveja, a sangria, as cidras ou a chamada da “cerveja doce”. Os indivíduos do sexo feminino apostam de uma forma clara e inequívoca num tipo de bebidas “leves” e modernas, tais como a sangria (no topo), seguindo-se das cidras e das “cervejas doces”. Além disso, a sangria é vista como uma bebida económica e rentável (muita quantidade por um baixo preço). Por outro lado, a sangria de fabrico na hora e/ou de fabrico “caseiro”, com personalização dos ingredientes (produto não industrializado) é a mais apetecível pela maioria dos indivíduos. A sangria caseira é conhecida por ter vinho de preço médio, mistura de outras bebidas espirituosas (*brandy*, licores etc.), sumo de limão, bebidas gaseificadas de limão, muita fruta (sobretudo frutos vermelhos), açúcar amarelo ou mascavado, canela e ervas aromáticas como a hortelã. Além disso, é tipicamente servida bem fresca, num jarro com pedras de gelo. O preço é bastante acessível, porque com uma “soma” de produtos, consegue-se produzir uma grande quantidade de sangria.

Já a Sangria engarrafada de fabrico “industrial” é uma bebida maioritariamente consumida como “SOS”, ou seja, é comprada apenas numa situação imprevista, ou para consumo de convívio “*Gathering*”. Tem como aspeto positivo possuir um preço muito económico que permite um elevado consumo, ao baixo preço. Dentro da vertente de sangrias industrializadas existem duas gamas, a sangria *Mass Market* e a sangria *Premium*, cuja diferença está presente na Figura 4.



Figura 4 – Diferença entre a gama de Sangria *Mass Market* e Sangria *Premium* (Fieldwork quality, 2015).

A caracterização de uma sangria *Premium* foi no geral bem aceite pelos participantes do estudo de mercado, no entanto com algumas reticências, sobre o preço. Isto porque a sangria é vista e associada a um produto económico, utilizada em momentos de convívio, onde o fator preço está sempre presente, dada a necessidade das faixas etárias mais jovens consumirem elevadas quantidades de sangria. Ou seja, a qualidade é bem aceite e bem presente, mas se o preço não for um fator de exclusão.

O preço “exercitado” para a sangria *Premium* foi, no geral, bem tolerado, mas a aceitação foi dependente do produto testado, género e idade. No geral, os resultados nesse estudo demonstraram que o espaço de preço pode ser preenchido com o conceito de uma sangria *Premium*, mas com um limite máximo de 3 € por embalagem.

A partir destas evidências, produziram-se formulações de sangria na Aveleda, SA e realizaram-se provas. O produto foi bem aceite internamente e, por isso, houve interesse em verificar a aceitabilidade do mesmo em consumidores, efetuando testes de preferência em comparação com sangrias já existentes no mercado. O público-alvo estabelecido foram os jovens entre 18 e 25 anos, por estar associado ao espírito académico e ainda, por ser uma bebida fácil de preparar com recursos limitados. Foi pedida ainda a opinião acerca da imagem/rotulagem da garrafa, assim como para o material de embalagem (o facto de ser de vidro). A caracterização geral da sangria do tipo *Premium* elaborado pelo departamento de marketing da Aveleda encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização geral da Sangria tinta *Casal Garcia*

Caraterização da Sangria <i>Casal Garcia</i>	
	Sangria <i>Premium</i>
	Base vínica tinta com aromas típicos de Sangria: laranja, toranja, limão, canela Titulo Alcoométrico Volúmico (TAI): 8 % Perfil doce e frutado; Gaseificação: ligeiramente gaseificado (inferior à média de gaseificação dos Vinhos Verdes em geral e do Casal Garcia em particular); Produto de elevada qualidade e consistência: em prova realizada no estudo de mercado em Portugal, foi a mais preferida de forma espontânea entre as sangrias avaliadas.

### 2.1.1.3 Ingredientes

#### Vinho

A sangria envolve sempre vinho. Uma vez que o vinho é o principal ingrediente e ainda não existe informação detalhada de sangria, os capítulos seguintes serão relativos ao produto vinho. A sangria é tradicionalmente um ponche de vinho tinto. Os espanhóis disfrutam desta bebida, criando-a

principalmente com Rioja e outros vinhos tintos espanhóis. A sangria pode também ser feita com vinho branco. Com vinho branco, a sangria é conhecida por sangria branca. A área de produção de Cava (vinho espumante espanhol) rapidamente criou uma versão de sangria de espumante branco.

Qualquer que seja o vinho que mais se aprecie, a sangria pode ser feita com ele. Atualmente, sabe-se que alguns tipos de vinho tendem a saber melhor com frutas do que outros. É necessário misturar e combinar até encontrar a combinação ideal. Algumas pessoas preferem vinhos mais doces, outras preferem vinhos mais secos (Shea, 2012).

### Fruta/ Berries

No caso da sangria preparada em casa, o ideal é mesmo usar fruta fresca, sem estar demasiado madura. Uma solução que funciona é manter alguns sacos de frutas e *berries* no congelador. Assim, servem como cubos de gelo natural e também adicionam sabor, quando derretem, em vez de, diluir a mistura. Por parte do consumidor também podem ser utilizados recipientes de plástico com gelo incorporado. Dessa forma, mantém a bebida agradável e fresca, mas também não dilui os sabores da sangria (Shea, 2012).

Em termos de frutas, existem variadíssimas opções, desde mirtilos, laranja às rodela, morangos, alguns cortados, alguns inteiros, pedaços de pêsego, kiwis, etc. A fruta cortada em pequenos pedaços é divertida de ingerir e de desfrutar com o líquido, mas pedaços maiores poderão ser um risco de asfixia. Adicionar morangos inteiros, por exemplo, adiciona apelo visual e também é fácil de agarrar com os dedos.

No sul de Espanha a sangria é chamada frequentemente de *zurra*. Esta versão da sangria é criada com pêsego ou nectarina (Shea, 2012).

No Reg. (UE) n.º 251/2014 é referido que apenas é permitido a adição de aroma, sumo e/ou polpa ou casca de citrinos para sangria comercializada *ready-to-drink*. A adição de outros frutos pode ser realizada pelo consumidor.

### Licores

A sangria preparada em casa também pode conter um componente mais alcoólico. Pode-se adicionar licor, um pouco de conhaque ou de vodka, rum, gin para não alterar muito o sabor, ou então adicionar *Grand Marnier* (sabor a laranja) ou *Midori* (sabor a melão), *Triple Sec*, *Peach Schnapps* ou muitos

outros licores aromatizados para obter algum sabor adicional. Os licores com sabor a fruta combinam muito bem com sangria. Dessa forma, os aromas de frutos são absorvidos pela mistura (Shea, 2012).

No caso de sangria para comercializar, apenas é permitido o que se encontra referido na Tabela 2, na secção correspondente à adição de álcool.

### Especiarias

O gengibre funciona muito bem em sangrias, acrescentando um sabor picante. A casca de laranja é outro grande produto possível de adicionar às sangrias para proporcionar também um sabor picante. Várias pessoas misturam *red hots* (é um doce vermelho picante com sabor a canela) também para proporcionar um sabor picante (Shea, 2012).

Dentro deste subcapítulo será explicado mais detalhadamente o gengibre, uma vez que foi utilizado numa formulação de sangria.

O gengibre, uma das especiarias mais antigas do mundo, tem sido bastante utilizado em diversos alimentos e bebidas (Larsen *et al.*, 1999). Os componentes característicos de gengibre incluem o óleo essencial e a oleorresina, que são responsáveis pelo seu comportamento perfumado e picante, respetivamente. O óleo essencial consiste, principalmente, em monoterpenos e sesquiterpenos, nomeadamente, zingibereno, limoneno, linalol, geraniol e nerolidol. A oleorresina é composta por compostos fenólicos não voláteis conhecidos como gingerol, sogaol e gingerona (Huang *et al.*, 2012; Jayashree *et al.*, 2014). O limoneno é um composto que proporciona o sabor a limão, o que é interessante para uma sangria. O gengibre seco pode ser utilizado para o fabrico de especiarias, medicamentos e cosméticos, bem como alimentos com sabor de gengibre, como refrigerantes e doces (Kejing *et al.*, 2016).

### Edulcorantes

Os edulcorantes permitidos na produção de sangria industrializada são apresentados na Tabela 2. Neste subcapítulo serão apenas referidos o mosto concentrado retificado (MCR) e os glicosídeos de steviol. Os glicosídeos de steviol mesmo não sendo permitidos, foram utilizados para teste neste trabalho.

Mosto concentrado retificado: Segundo o Reg. (UE) n.º 491/2009, o mosto concentrado retificado é “um produto líquido não caramelizado obtido por desidratação parcial do mosto de uvas, efetuada por

qualquer método autorizado, excluindo a ação direta de calor, de modo a que o valor indicado à temperatura de 20 °C, pelo refratómetro, não seja inferior a 61,7 %". Como o próprio nome indica foi sujeito a tratamentos autorizados de desacidificação e de eliminação de componentes, com exceção do açúcar. Possui um pH inferior a 5 e não contém sacarose.

Glicosídeos de Steviol: A *Stevia rebaudiana* (Bertoni) é um arbusto espesso ramificado da família Asteraceae, nativa da região do nordeste do Paraguai (Soejarto, 2002). O steviosídeo, um dos glicósidos de stevia é cerca de 300 vezes mais doce do que a sacarose, com as vantagens adicionais de ter poder calórico nulo e zero hidratos de carbono, não causando picos nos níveis de açúcar no sangue. A doçura desta planta é devida à presença de glicosídeos de steviol: steviosídeo (4 % a 13 %), rebaudiosídeo A (2 % a 4 %), rebaudiosídeo C (1 % a 2 %), dulcosídeo A (0,4 % a 0,7 %), e outros menos abundantes, tais como steviolmonosídeo, rubusosídeo, steviolbiosídeo, rebaudiosídeo B e rebaudiosídeo F. O rebaudiosídeo A é conhecido por ser ainda mais doce (até 450 vezes mais doce do que a sacarose) e pode ser refinado para obter um grau de pureza superior a 97 %. Os extratos de steviosídeos não são fermentescíveis e não são tóxicos (Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

A dose diária aceitável para os glicosídeos de steviol, por peso corporal, é de 4 mg/kg (JECFA, 2008). A *European Food Safety Authority* (EFSA) permitiu a utilização de extratos das folhas de *Stevia* para uso alimentar (EFSA, 2011). No Reg. (UE) n.º 1131/2011 ainda não é referido um limite da quantidade permitida de glicosídeos de steviol em bebidas aromatizadas à base de vinho, que é o caso da sangria.

#### 2.1.1.4 Processo produtivo

Como foi referido, o vinho é o principal ingrediente da sangria.

Resumidamente, as uvas são colhidas e prensadas e, de seguida, o mosto obtido é fermentado, eventualmente na presença do engaço e/ou das películas por leveduras (fermentação alcoólica) e, depois opcionalmente por bactérias (fermentação malolática), sendo esta opcional. Após a fermentação, o vinho sofre maturação e é engarrafado. No caso da presença de engaços e/ou películas, procede-se à sua remoção, anteriormente à maturação. Cada um dos processos, desde a pré-fermentação e fermentação até às etapas de pós-fermentação devem ser consistentes e cuidadosamente executados para se obter um vinho de alta qualidade (Hutkins, 2006). Um bom vinho para sangria tinta pode ser, por exemplo, um vinho da casta *Cabernet Sauvignon* por ser leve e frutado (Shea, 2012). Todas as etapas necessárias para a produção de vinho branco, rosado e tinto e a posterior produção de sangria encontram-se na Figura 5.

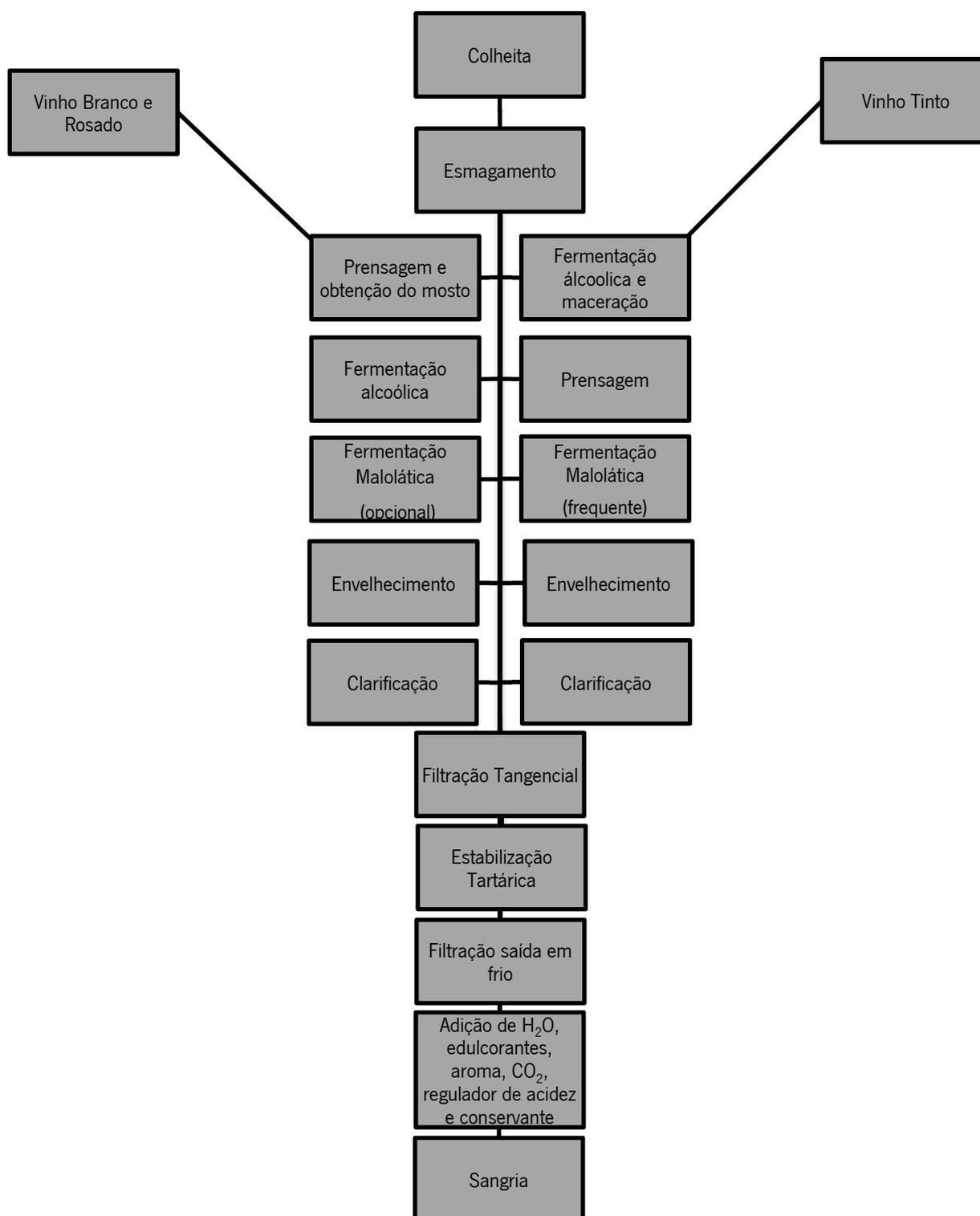


Figura 5 – Fluxograma genérico da produção de vinho branco, tinto e rosado e de sangria (Aveleda, 2015; Hutkins, 2006; Jackson, 2008).

## 2.2 Tempo de prateleira de alimentos

Em cada alimento em particular existe um determinado tempo finito, após a sua produção, que irá reter um nível de qualidade organolética exigida e de segurança prudente, sob condições estabelecidas de armazenamento (Taoukis *et al.*, 1997). Este período de tempo pode ser designado por tempo de prateleira, vida útil de um alimento ou tempo de vida útil de um alimento.

A estabilidade físico-química, sensorial e microbiológica são características extremamente desejáveis em alimentos. Ao adquirir um produto, o consumidor deseja que ele mantenha a sua qualidade pelo maior tempo possível, tanto do ponto de vista microbiológico, como do sensorial (Leite *et al.*, 2005).

O prazo de validade de um produto/alimento começa a partir do momento em que é preparado ou produzido, correspondendo ao período de tempo em que este se encontra com qualidade adequada em termos de valor nutricional, de sabor, de textura e de aparência e permanece seguro sob o ponto de vista físico, químico e microbiológico (Manzocco, 2012; Nicoli, 2012). O prazo de validade de alimentos é determinado, rotineiramente para cada produto em particular pelo produtor ou processador e os estudos de armazenamento são uma parte essencial do desenvolvimento do produto (Gordon e Robertson, 2000).

### 2.2.1 Fatores que afetam o tempo de prateleira

Para estabelecer o tempo de prateleira de um alimento existem etapas comuns a seguir ao conceber o estudo. Pode variar de acordo com o conhecimento prévio que se tem do produto alimentar, nomeadamente, os fatores que delimitam o seu tempo de prateleira. Em geral, o tempo de prateleira de um produto é influenciado pela formulação, pelo processamento, pelos atributos físico-químicos e microbiológicos, pela embalagem, pelas condições de armazenamento e distribuição e pelos métodos de consumo (Galić *et al.*, 2009).

A maioria dos alimentos são perecíveis, uma vez que são submetidos a alterações na sua estrutura, composição e nas suas propriedades durante o seu armazenamento antes do consumo. Estas alterações são de origem físico-química atribuída à composição alimentar juntamente com a ação dos fatores ambientais intrínsecos e extrínsecos e também microbiológicos onde a flora de deterioração desempenha um papel importante. Estas modificações proporcionam deteriorações sensoriais (Valero *et al.*, 2012). Na Figura 6 está presente um esquema com os fatores que afetam o armazenamento dos alimentos.

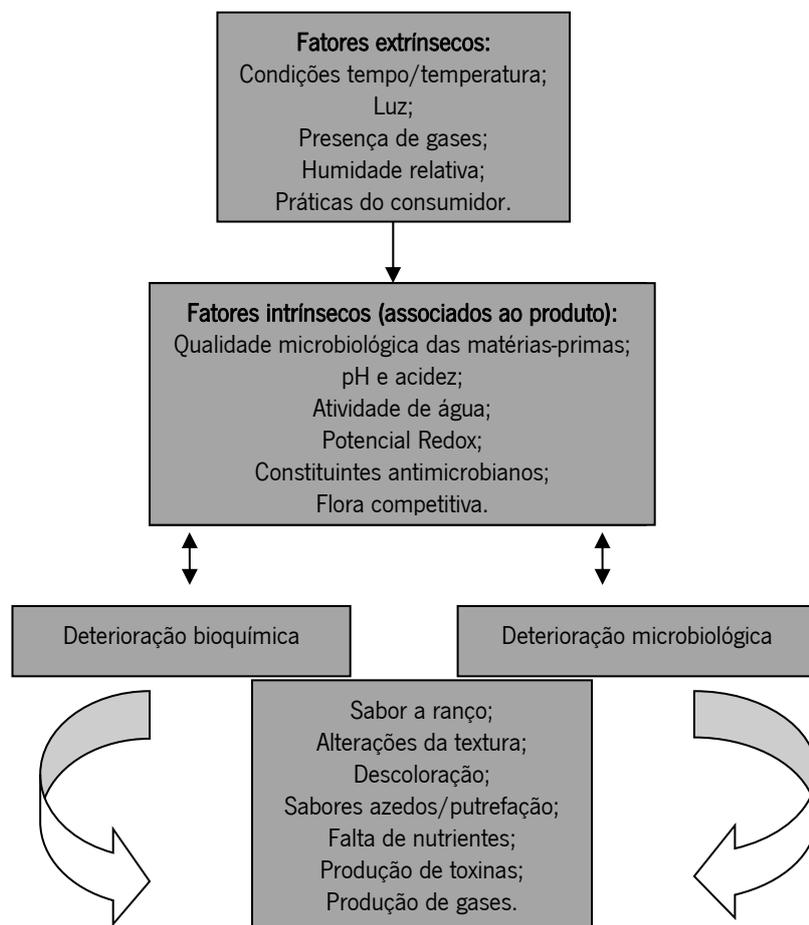


Figura 6 – Processos de deterioração durante o armazenamento de alimentos (adaptado de Huis in 't Veld, 1996).

### 2.2.2 Métodos de estudo do tempo de prateleira

Os principais passos para a conceção de um estudo do tempo de prateleira de alimentos estão focados no tempo de duração do estudo, tipos de testes, frequência e quantidade de amostragem e controlos que serão realizados até que o alimento apresente uma deterioração significativa. Normalmente, é efetuado um controlo a nível microbiológico, sensorial e físico-químico. É ainda relevante, a identificação de descritores críticos e o seu limite de aceitação. Depois é necessário realizar a monitorização de determinado parâmetro de qualidade específico para cada alimento (Kilcast e Subramanian, 2011; Calligaris e Manzocco, 2012).

Para projetar um estudo de tempo de prateleira, fatores como temperatura, humidade relativa, condições de iluminação, etc., devem ser estritamente controlados, de preferência num laboratório certificado. Além disso, o projeto deve ser simples, fácil de realizar e interpretável por operadores do setor alimentar (Valero *et al.*, 2012).

As informações preliminares, nomeadamente dados históricos de processamento e as condições de armazenamento, as características dos alimentos, dados históricos microbiológicos, entre outros, ou através de estudos já publicados e, neste caso, aplicados a produtos semelhantes ao alimento em estudo, são muito úteis para aperfeiçoar o projeto experimental (NZFSA, 2005).

É importante ter em consideração que a Legislação Internacional atual não prevê a aplicação de protocolos padrão de forma a estabelecer o prazo de validade dos produtos alimentares. Contudo, têm sido publicadas várias Diretrizes Nacionais e Internacionais para este fim, que sugerem diferentes métodos e protocolos de análises focados, principalmente em alimentos prontos a comer (FSAI, 2005; NZFSA, 2005; Valero *et al.*, 2012).

No estudo do tempo de prateleira de um alimento podem ser utilizados métodos de estudo reais (diretos) ou acelerados (indiretos).

#### 2.2.2.1 Métodos diretos

Os métodos diretos são os mais comuns e implicam um armazenamento do alimento em condições previamente selecionadas, num intervalo de tempo definido e com monitorização regular para verificar se o alimento apresenta alterações, ao longo do tempo e que podem pôr em causa o seu consumo (NZFSA, 2005).

Para determinar o tempo de prateleira de um alimento em tempo real são necessárias as seguintes etapas (Labuza & Fu, 1997; NZFSA, 2005):

- 1) Identificação das causas de degradação do alimento;
- 2) Seleção dos ensaios a realizar;
- 3) Planeamento do estudo do tempo de prateleira;
- 4) Realização do estudo do tempo de prateleira;
- 5) Determinação do tempo de prateleira;
- 6) Monitorização do tempo de prateleira após a comercialização do produto.

#### 2.2.2.2 Métodos indiretos

Atualmente, os produtores de alimentos enfrentam uma forte pressão para desenvolver novos produtos que requerem maior tecnologia no menor tempo possível. Espera-se que a maior parte desses produtos tenha um tempo de prateleira de várias semanas ou mesmo meses, enquanto que o tempo disponível para os testar é reduzido a alguns dias ou semanas. Os ensaios acelerados são usados para obter informações de determinadas variáveis em tempo reduzido, por exemplo, a temperatura ou a humidade. Esta informação é geralmente extrapolada para obter estimativas do tempo de prateleira em

níveis normais das variáveis, sem aceleração. Os ensaios acelerados tornaram-se cada vez mais importantes devido a mudanças das tecnologias, à existência de produtos alimentares mais elaborados, às expectativas dos consumidores mais elevadas e à necessidade de um rápido desenvolvimento de produto (Meeker e Escobar, 1998).

Em muitas indústrias de alimentos, os ensaios acelerados envolvem apenas uma condição. Assume-se, por exemplo, que, se um produto dura 1 mês a 40 °C, dura 4 meses a 20 °C (temperatura ambiente). Assim, presume-se que o fator de aceleração de 20 °C para 40 °C é igual a 4. Muitas vezes, este valor é uma tradição na empresa com origem desconhecida, mas outras vezes, é estimado a partir de dados de estudos de um produto semelhante (Nelson, 1990).

A cinética química, o estudo das taxas e mecanismos através dos quais uma espécie química se converte noutra e a relação de Arrhenius, que descreve a influência da temperatura sobre as constantes de velocidade de reação, são utilizados em modelos de alterações da qualidade dos alimentos.

A dependência da temperatura sobre a constante de velocidade de uma reação é expressa pela equação de Arrhenius que pode ser escrita sob a forma da Equação 1.

$$k = k_0 e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (\text{Eq. 1})$$

A constante de velocidade  $k$  é uma medida da extensão da reação, a uma determinada temperatura absoluta ( $T$ );  $R$  é a constante universal dos gases. O parâmetro  $E_a$  é a energia de ativação, que constitui uma medida da sensibilidade em relação à temperatura;  $k_0$  é o fator de pré-exponencial, que tem as unidades de  $k$ .

A maioria das reações responsáveis pela perda de qualidade, com base num índice físico-químico, microbiano ou sensorial característico de determinado alimento são calculadas com base em reações de ordem zero e ordem um (Taoukis *et al.*, 1997). Os dados de determinado parâmetro de qualidade devem ser ajustados às equações que descrevem melhor a sua evolução. As reações de ordem zero representam a evolução linear da perda ou ganho de um parâmetro de qualidade e as reações de primeira ordem apresentam uma evolução exponencial (Palazón *et al.*, 2009).

Para a determinação do tempo de prateleira recorre-se à monitorização da variação de um atributo de qualidade ( $Q$ ) ao longo do tempo, a uma temperatura constante. A expressão da variação do atributo de qualidade ( $Q$ ) ao longo do tempo está presente na Equação 2 (Labuza, 1985):

$$\frac{dQ}{dt} = \pm k Q^n \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde,  $t$  é o tempo;  $\pm$  refere-se quer ao aumento, quer à diminuição do atributo  $Q$  ao longo do tempo,  $k$  é a constante de velocidade de reação e  $n$  é a ordem da reação.

A constante de velocidade de reação é graficamente calculada usando a equação 3 ou equação 4 dependendo da ordem de reação, 0 ou 1, respetivamente.

$$Q_0 - Q = kt \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\ln\left(\frac{Q_0}{Q}\right) = kt \quad (\text{Eq. 4})$$

$Q_0$  é o valor inicial de atributo de qualidade.

Na Tabela 4 estão presentes as equações linearizadas utilizadas tendo em conta o tipo de deterioração da qualidade alimentar (ordem 0 e 1). As equações 5 e 6 correspondem à linearização das equações 3 e 4, respetivamente.

Tabela 4 – Modelos cinéticos e a respetiva aplicação do tipo de deterioração alimentar (Adaptado de Galić *et al.*, 2009)

Ordem da reação	Equações	Apresentação em Gráfico	Declive	Ordenada na origem	Exemplos de aplicações de deterioração da qualidade alimentar
0	$Q = Q_0 - kt$ (Eq. 5)	$Q$ vs $t$	$-k$	$Q_0$	pH; acidez; alterações de alimentos congelados; Reação de Browning não enzimática
1	$\ln Q = \ln Q_0 - kt$ (Eq. 6)	$\ln Q$ vs $t$	$-k$	$\ln Q_0$	Perda de textura em processamentos térmicos; crescimento/morte microbiana, perda de vitaminas, oxidação, perda de cor

Para estimar o efeito da temperatura na velocidade da reação de um determinado tipo de deterioração de qualidade em específico, os valores de  $k$  são estimados a diferentes temperaturas de interesse e  $\ln k$  é representado graficamente em relação ao inverso das temperaturas utilizadas em estudo ( $1/T$ ). Obtém-se uma reta com a inclinação de  $(E_a/R)$ , a partir da qual se calcula a energia de ativação.

Um outro método, que também exprime a dependência da temperatura na deterioração de alimentos e que pode ser utilizado para a determinação do tempo de prateleira é a abordagem  $Q_{10}$ . O  $Q_{10}$  é definido como a proporção entre a velocidade de reação ( $k$ ) a uma temperatura em comparação com

uma temperatura superior 10 °C [ $k_{(T+10\text{ °C})}$ ]. Também é definida como a razão entre o tempo de prateleira a uma determinada temperatura e a uma temperatura mais elevada 10 °C. Por exemplo, um  $Q_{10}$  de 2 significa que o tempo de prateleira a 30 °C é metade do tempo a 20 °C. O  $Q_{10}$  é determinado a partir da Equação 7 (Gálic *et al.*, 2009; Singh, 1994).

$$Q_{10} = \frac{k_{(T+10\text{ °C})}}{k_{(T)}} \quad (\text{Eq. 7})$$

A partir da energia de ativação de Arrhenius ( $E_a$ ) ou o  $Q_{10}$ , o tempo de prateleira pode ser previsto a qualquer temperatura (Mizrahi, 2004). Assim, através do estudo de um processo de deterioração e medindo a taxa dessa deterioração em duas ou três temperaturas (acima da temperatura normal de armazenamento), pode-se, em seguida, extrapolar num gráfico de Arrhenius com uma linha reta e, por conseguinte prever a taxa de deterioração na temperatura de armazenamento desejada. Esta é a base da determinação do tempo de prateleira a partir de testes acelerados (Gálic *et al.*, 2009).

A partir da equação de Arrhenius é possível obter um fator de aceleração ( $FA$ ) que corresponde à velocidade de deterioração, entre a temperatura de referência e a temperatura que foi utilizada para acelerar a deterioração. A expressão que exprime essa relação está descrita na Equação 8 (Hough *et al.*, 2006).

$$FA = \frac{k(T)}{k(T_u)} = e \left[ \frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T_u} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde  $T_u$  corresponde à temperatura de utilização do produto;  $k$  é a constante de velocidade dessa deterioração.

O valor de  $E_a/R$  indicado na equação 8 pode ser utilizado para obter o tempo de prateleira a temperaturas que não foram testadas.

O tempo de prateleira,  $t_p$  (*i.e.* tempo de uso,  $t_u$ ) pode então ser determinado a partir do tempo conhecido para o teste acelerado (*i.e.* para  $T_a$ ) (Equação 9):

$$t_u = t_p = FA \times t_{T_a} \quad (\text{Eq. 9})$$

Além da utilização dos testes acelerados, podem-se utilizar métodos preditivos microbiológicos. Estes modelos utilizam equações matemáticas, que usam informação de bases de dados científicas, para prever o crescimento microbiano sob condições definidas (Baty e Delignette-Muller, 2004). Estes modelos são úteis como um primeiro passo para a avaliação do prazo de validade de um produto

alimentar, mas não podem substituir as análises microbiológicas. Além disso, apesar da informação recolhida apresentar grande utilidade, deve ser comprovada com estudos acelerados ou com métodos diretos de estimativa do prazo de validade (Labuza, 2000).

O fim do tempo de prateleira ocorre quando um determinado produto se torna inaceitável por um grupo de provadores ou quando se atingem valores de um atributo de qualidade-chave discordantes do pretendido. Este parâmetro deve representar adequadamente o envelhecimento do produto e deve ser facilmente mensurável. Além disso, as análises sensoriais podem ser uma ferramenta relevante nos estudos, em que a seleção de indicadores de deterioração não é fácil (Palazón *et al.*, 2009).

## 2.2.3 Fenómenos de deterioração de vinho

### 2.2.3.1 Oxidação

O aroma é um dos atributos de qualidade mais importantes dos vinhos e, pode determinar a escolha do consumidor. É o resultado da ação de uma grande variedade de compostos químicos (álcoois, ésteres, ácidos, aldeídos, cetonas, lactonas, terpenos e fenóis, entre outros), suficientemente voláteis, isto é, que passam facilmente para a fase de vapor e alcançam os sentidos humanos com um aroma específico. Os ésteres de ácidos gordos e os acetatos de álcoois superiores contribuem para o aroma do vinho com odores frutados (Antalick *et al.*, 2010; Chaves *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2010). Assim, a identificação e a avaliação quantitativa destes compostos voláteis podem ser uma importante fonte de informação sobre a qualidade do vinho. É muito importante dispor de ferramentas analíticas adequadas para a deteção de compostos de aroma e, assim, serem utilizados para a seleção e controlo de qualidade de vinhos. A cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS) é a técnica mais utilizada para a análise dos compostos voláteis do aroma de vinho com uma elevada eficiência de separação e sensibilidade (Armanino *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2005). Existe uma vasta gama de ferramentas analíticas para a extração de compostos voláteis, nomeadamente, a extração líquido-líquido, a extração em fase sólida e a microextração em fase sólida (Vilanova e Oliveira, 2012). A extração líquido-líquido com diclorometano dos compostos voláteis tem sido utilizada (Kotseridis e Baumes, 2000).

As alterações químicas que afetam frequente e negativamente o tempo de prateleira são aquelas que estão associadas à oxidação e hidrólise de compostos aromáticos. Os envolvidos na redução, polimerização, rearranjo da estrutura e volatilização têm mais probabilidade de serem inicialmente favoráveis. Subsequentemente, mudanças no aroma varietal, buquê de fermentação, e na cor modificam progressivamente os atributos originais do vinho. Estas alterações podem ou não ser vistas

como desejáveis. É essencial minimizar o consumo do oxigénio de forma a maximizar o tempo de prateleira. No caso do vinho tinto, a oxidação controlada pode ser benéfica, pois reduz a adstringência. A molécula de oxigénio é relativamente estável no vinho. Para ocorrer fenómenos de oxidação, o oxigénio tem de ser convertido em formas mais ativas, nomeadamente, peróxido de hidrogénio, oxigénio molecular, superóxido ou o radical hidróxido. Estes compostos podem ser produzidos por meio de iões metálicos de transição reduzidos, por exemplo, Fe (II) (Danilewicz 2003; Jackson, 2011). Os constituintes de vinhos tintos e brancos são capazes de reagir com quantidades significativas de oxigénio, sendo os polifenóis, particularmente *o*-difenóis, os constituintes suscetíveis de ser facilmente oxidados. A oxidação de flavonoides, nomeadamente as catequinas e os seus polímeros, a quinonas, altera as propriedades cromáticas, gerando pigmentos amarelados e acastanhados. Esses tendem a reagir com o acetaldeído que resulta da oxidação do etanol, favorecendo a polimerização entre antocianinas e flavanóis (catequinas e taninos condensados), o que favorece a estabilização da cor dos vinhos tintos (Jackson, 2011; Lee *et al.*, 2004).

A presença limitante de oxigénio pode favorecer a hidrólise de aromas fornecidos por estéres frutados e alguns terpenos. Em contrapartida, aromas menos desejáveis derivados de aldeídos, dietilésteres e tióis podem acumular-se (Jackson, 2011).

Uma grande variedade de *off-flavours* pode ser formada a partir da oxidação do vinho. A baixas concentrações, estes compostos de aroma podem aumentar a complexidade de um vinho mas, a partir de determinada concentração reduzem a sua qualidade. Tem sido relatado que a degradação aromática ocorre antes da degradação cromática (Escudero *et al.*, 2002).

### 2.2.3.2 Deterioração microbiana

A maneira mais eficaz para controlar a deterioração microbiana em vinhos é entender quais são os microrganismos indesejáveis que possam estar presentes e os potenciais problemas que podem causar. Durante a conservação ou o envelhecimento do vinho, e, portanto da sangria, existem alguns microrganismos, nomeadamente bactérias acéticas, lácticas e leveduras como *Brettanomyces/ Dekkera* spp. que podem causar a sua deterioração. Todos estes microrganismos têm diferentes necessidades de crescimento e tolerâncias para compostos inibidores, e estes fatores desempenham um papel importante na determinação da ecologia microbiana do vinho (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Osborne, 2010).

### Bactérias Acéticas

As bactérias de ácido acético são um grupo de microrganismos incluídos na família Acetobacteraceae, sobretudo dos géneros *Acetobacter* e *Glucanobacter* que têm uma característica única de oxidação do etanol em ácido acético, o que dá origem ao seu nome.

As bactérias acéticas são gram-negativas, de forma elipsoidal a alongada (bastonetes). A sua largura varia entre 0,4 µm e 1 µm e o seu comprimento varia entre 0,8 µm e 4,5 µm. São catalase-positiva e oxidase-negativa (De Ley *et al.*, 1984).

O seu crescimento é especialmente reforçado quando o oxigénio está presente ou especificamente adicionado, o que é um importante fator de controlo a ter em conta na sua inibição. O seu pH ótimo varia entre 5,5 e 6,3 (De Ley *et al.*, 1984). No entanto, conseguem sobreviver e crescer no pH do vinho que pode ser tão baixo quanto 3,0 a 4,0 (Du Toit e Pretorius, 2002). O intervalo de temperatura de crescimento ótima é de 25 °C a 30 °C, mas algumas estirpes podem crescer muito lentamente a 10 °C (De Ley *et al.*, 1984; Joyeux *et al.*, 1984).

O SO<sub>2</sub> é usado para o seu controlo, mas a concentração requerida depende da espécie/estirpe e do pH do vinho (Du Toit e Pretorius, 2002; Du Toit *et al.*, 2005). É recomendada a concentração de SO<sub>2</sub> molecular entre 0,7 mg/L e 1 mg/L como necessário para inibir todas as espécies dos géneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

### Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas, na maioria, são gram-positivas, catalase-negativa, aerotolerantes, ácido-tolerantes e anaeróbias facultativas (Hutkins, 2006a).

As bactérias lácticas podem ser homo ou heterofermentativas. As bactérias lácticas heterofermentativas são as mais comuns em mostos e vinhos. Neste ambiente as estirpes que predominam são as que estão mais adaptadas a pH baixo e a um elevado teor de etanol. O mosto e o vinho possuem bactérias estritamente heterofermentativas, nomeadamente, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus brevis*, e heterofermentativas facultativas, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus* (Rodas *et al.*, 2005). As bactérias lácticas homofermentativas do género *Pediococcus* também são capazes de crescer em vinho e em mosto, mas são normalmente encontradas em densidades celulares baixas.

As bactérias lácticas isoladas de vinho crescem entre 15 °C e 45 °C no laboratório, com um intervalo de temperatura ótima entre 20 °C e 37 °C. O melhor crescimento no mosto, durante a fermentação maloláctica é obtido a cerca de 20 °C. O pH do vinho tem um efeito seletivo sobre as espécies.

Em vinhos com pH abaixo de 3,5, *O. oeni* geralmente domina, enquanto que em vinhos com pH acima de 3,5, dominam espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Devido à sua tolerância ao etanol e a condições ácidas, as bactérias lácticas geralmente são inibidas apenas para valores de título alcoométrico volúmico acima de 8 %, mas *O. oeni* tolera 14 %, e *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fructivorans* e *Lactobacillus hilgardii* podem ser encontrados até mesmo em vinhos fortificados, com cerca de 20 % (Lonvaud-Funel, 1995; Ribéreau-Gayan *et al.*, 2006).

Em relação à sensibilidade ao SO<sub>2</sub>, geralmente, a concentrações de 50 mg/L a 100 mg/L de SO<sub>2</sub> total e 1 mg/L a 10 mg/L de SO<sub>2</sub> livre, o crescimento de bactérias lácticas e da fermentação maloláctica podem ser inibidos. Henick-Kling (1993) relatou uma inibição total para valores de 100 mg/L de SO<sub>2</sub> total.

### *Brettanomyces/ Dekkera*

A *Brettanomyces bruxellensis* é uma espécie de levedura conhecida na indústria do vinho devido às grandes perdas económicas que pode causar. *Brettanomyces* spp., designado por *Dekkera* na forma esporulada é responsável pelo desenvolvimento de odores indesejáveis, enumerados por diversos descritores como “animal”, “estábulo”, “suor de cavalo”, “plástico queimado”, “medicinal ou fenólico”. Os compostos associados a estes descritores são alguns fenóis voláteis, principalmente o 4-etilfenol e 4-etilguaiacol, mas também 4-vinilfenol e 4-vinilguaiacol, correspondentes a metabolitos secundários que podem ser produzidos por *Brettanomyces* a partir dos ácidos fenólicos presentes naturalmente no vinho (Kurtzman, 2011).

Estes defeitos nos vinhos tintos são detetados quando os fenóis voláteis estão acima do seu limiar de perceção (426 µg/L para uma mistura de 1:10 de 4-etilfenol e de 4-etilguaiacol, o que acontece quando a concentração celular de *Brettanomyces* supera 10<sup>3</sup> mL<sup>-1</sup> (Chatonnet *et al.*, 1992, 1995; Lonvaud-Funel e Renouf, 2005).

O controlo do crescimento de *Brettanomyces* durante a vinificação não é uma tarefa fácil. A levedura é relativamente tolerante ao SO<sub>2</sub>, como indicado por Sponholz (1993), que sugeriu o uso de 100 mg/L de SO<sub>2</sub> total, ou 30 mg/L a 50 mg/L de SO<sub>2</sub> livre para o seu controlo no vinho. O uso de SO<sub>2</sub> molecular entre 0,5 mg/L e 0,8 mg/L é recomendado (Henick-Kling *et al.*, 2000). No entanto, apesar do teor de SO<sub>2</sub> molecular ser dependente do pH, da temperatura e do título alcoométrico volúmico, pode-se considerar como referência, que 30 mg/L de SO<sub>2</sub> livre, correspondem a 0,4 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular, a pH 3,7, e 0,8 mg/L a pH 3,4.

Du Toit *et al.* (2005) sugeriram que *Brettanomyces* pode introduzir um estado "viável-mas-não-cultivável" na presença de SO<sub>2</sub>. E, como tal, a levedura pode escapar à deteção microbiológica convencional (em placa) antes do engarrafamento, podendo existir contaminação durante envelhecimento em garrafa se as condições o permitirem. Além disso, a bactéria possui resistência ao calor (Couto *et al.*, 2005).

## 2.2.4 Conservação de produtos vitivinícolas

Para Delfini *et al.* (1995), obter a estabilidade microbiológica de um vinho depende da interação entre quatro parâmetros: teor de SO<sub>2</sub> livre; pH; temperatura e título alcoométrico volúmico. O controlo do crescimento de microrganismos, em momentos críticos durante o processo de vinificação é vital para obter sucesso. As preocupações importantes incluem não só maximizar o desempenho fermentativo de *Saccharomyces* mas também gerir o crescimento de leveduras e de bactérias indesejáveis. O controlo da atividade microbiológica envolve o uso de aditivos químicos (conservantes e esterilizantes), bem como a remoção física por filtração ou outros métodos, e o controlo da temperatura na adega/cuba (Fugelsand e Edwards, 2007).

### 2.2.4.1 Meios Químicos

A preservação dos alimentos é importante para evitar a fermentação e a decomposição. Embora alguns métodos de conservação de alimentos (salga, fumagem, conservação em vinagre, etc.) sejam detetáveis pelo consumidor através do gosto ou odor, alguns conservantes químicos, tais como sais de ácido de benzoico e sais de ácido salicílico são indetetáveis uma vez que não têm sabor, são inodoros e incolores. Assim, a deteção de conservantes em alimentos tem sido um assunto de grande importância, embora a sua utilização tenha sido reduzida nos últimos anos devido à legislação no setor alimentar (Zacharis e Tzanavaras, 2013).

Segundo a Diretiva Comunitária 95/2/CE, o termo "conservante" diz respeito a "todas as substâncias que prolongam a durabilidade dos géneros alimentícios contra a deterioração causada por microrganismos".

Os conservantes (agentes antimicrobianos) são capazes de retardar ou impedir o crescimento de microrganismos, tais como leveduras, bolores, bactérias ou fungos, e a subsequente deterioração de alimentos. Os principais mecanismos de ação são reduzir a disponibilidade de água e aumentar a acidez. Os conservantes alimentares mais importantes usados incluem o ácido sórbico e o seu sal de potássio, propionatos de cálcio e de sódio, benzoatos de sódio e de potássio e parabenos.

O dióxido de enxofre e os sulfitos também são usados extensivamente para controlar microrganismos indesejáveis nos refrigerantes, sumos, vinho, cerveja e outros produtos.

Os conservantes químicos desempenham um papel muito importante na indústria de alimentos, desde do fabrico até à distribuição ao consumidor final. A escolha de um conservante tem em consideração o produto a ser preservado, o tipo de microrganismo de deterioração endémica, o pH do produto, o tempo de prateleira e a facilidade de aplicação. Nenhum conservante pode ser usado em todos os produtos para controlar todos os microrganismos, e portanto, são muitas vezes utilizadas combinações. Em certos alimentos, os conservantes específicos têm muito pouca concorrência. Nas concentrações utilizadas, na prática, nenhum dos conservantes é letal para os microrganismos em alimentos. Em vez disso, a sua ação é inibidora.

### Sulfitos

O dióxido de enxofre (E220) é um antioxidante que possui também propriedades antimicrobianas e é utilizado, tanto na indústria de vinho, como de alimentos. Os vinhos que contêm uma concentração de dióxido de enxofre superior a 10 mg/L devem divulgar essa informação no rótulo, porque o dióxido de enxofre é um metabolito produzido pelas leveduras durante a fermentação, por isso, os vinhos geralmente contêm alguns sulfitos, mesmo que não tenham sido adicionados durante o processamento [Reg. (UE) n.º1169/2011].

O SO<sub>2</sub> inibe microrganismos por vários meios, incluindo a rutura de pontes de dissulfureto nas proteínas e a reação com co-fatores, incluindo NAD<sup>+</sup> e FAD<sup>+</sup>. Também reage com o ATP e provoca a desaminação de citosina em uracilo, aumentando a probabilidade de mutações letais (Ough, 1993b; Romano e Suzi, 1993a). A concentração de SO<sub>2</sub> molecular necessária para evitar o crescimento de microrganismos varia com o pH do vinho/sumo, temperatura, diversidade e densidade populacional, a fase de crescimento, o teor em etanol, entre outros fatores (Fugelsand e Edwards, 2007).

### Ácido Sórbico e Sorbatos

O ácido sórbico (E200) e os seus sais, tais como o sorbato de sódio (E201), o sorbato de potássio (E202), e o sorbato de cálcio (E203) são sólidos e de cor branca. O ácido sórbico é principalmente sintetizado no laboratório, mas pode existir em muitas frutas como um composto endógeno. No entanto, os sais de sorbato são os mais utilizados, devido ao facto de a sua solubilidade ser superior em água. Os sorbatos são utilizados como agentes antimicrobianos em alimentos e bebidas. Alguns exemplos típicos de alimentos onde são utilizados sorbatos incluem os produtos de panificação (bolo,

torta, pão embalado, filhós, etc.), os produtos à base de frutas (compotas, sumos, frutas desidratadas, vinho, etc.), vegetais (salada fresca embalada, pickles, azeitonas, etc.) e produtos lácteos (queijo fresco ou processado, iogurtes, etc.) (Zacharis e Tzanavaras, 2013).

Considera-se que os sorbatos são as substâncias mais eficazes contra a deterioração de alimentos em comparação com outros conservantes (por exemplo, benzoatos, propionatos). Além disso, são utilizados principalmente em alimentos ligeiramente ácidos na gama de pH entre 5,5 e 6,0, e são praticamente ineficazes a valores de pH superiores a 7,0. Do ponto de vista tecnológico e económico, a quantidade deste tipo de conservantes deve ser determinada pelo processamento de alimentos. Os níveis de utilização típicos variam entre 0,025 % e 0,3 % (massa de conservante/massa de produto), dependendo da categoria de alimentos (GSFA, 2012).

Os sorbatos apresentam uma toxicidade aguda ou crónica muito baixa quando testados em animais. Embora não haja nenhuma investigação metabólica ou toxicológica em seres humanos, os sorbatos têm uma via metabólica semelhante aos ácidos gordos e, conseqüentemente, não há efeitos nocivos esperados, mesmo em níveis de concentração mais elevados do que os normalmente utilizados (GRAS, 2012).

O ácido sórbico é um ácido gordo insaturado de cadeia curta utilizado como conservante químico contra *Saccharomyces* em vinhos doces engarrafados. As bactérias lácticas não são inibidas por este conservante. De facto, algumas espécies podem reduzir o ácido sórbico (ácido 2,4-hexadienóico) ao respetivo álcool (2,4-hexadien-1-ol). Depois de se formar este composto, ao reagir com o etanol pode-se formar 2-etoxi-3,5-hexadieno (Crowell e Guymon, 1975), um composto que tem odor a folhas de gerânio esmagadas e tem um limiar de perceção olfativo baixo, de aproximadamente 100 ng/L (Riesen, 1992). O termo alemão original para este defeito é "gerânio," e não deve ser confundido com o geraniol, um monoterpene importante para o odor de algumas variedades de uva. Edinger e Splittstoesser (1986) relataram que todas as estirpes de *Oenococcus oeni* estudadas reduziram o ácido sórbico ao álcool sórbico mas observaram que estirpes dos géneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* não o conseguiram fazer. Com base nesses estudos, os produtores de vinho que desejam estabilizá-lo com sorbato, para o armazenamento a longo prazo, devem considerar a potencial presença e atividade de *O. oeni*. Na ausência de medidas para limitar o crescimento bacteriano (SO<sub>2</sub> ou filtração estéril), pode ocorrer então a redução do ácido sórbico no vinho, rearranjo químico e esterificação com etanol produzindo odor a "gerânio", indesejável. Para minimizar o potencial para este problema, o açúcar residual deve ser determinado para avaliar a possibilidade de vir a ocorrer fermentação malolática, e o vinho deve ser preferivelmente filtrado, sulfitado e armazenado a uma temperatura baixa até à sua utilização (Zacharis e Tzanavaras, 2013).

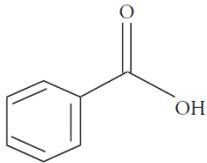
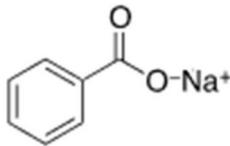
A eficácia de sorbato de potássio é baseada na sua capacidade de diminuir o metabolismo do ácido gordo nos microrganismos. Numa base de peso igual, o sorbato de potássio tem 74 % da atividade de ácido sórbico. O ácido sórbico e o sorbato de potássio são aditivos GRAS (Somogyi, 2006).

### Ácido Benzóico e Benzoatos

Os membros do grupo dos benzoatos incluem o ácido benzóico (E210), o benzoato de sódio (E211), o benzoato de potássio (E212) e o benzoato de cálcio (E213). Todas estas substâncias são sólidos brancos.

O ácido benzóico é um dos mais antigos conservantes químicos utilizados em alimentos, tendo sido descrito para o efeito em 1800 (Somogyi, 2006). O ácido benzóico tem solubilidade moderada em água e mais elevada em etanol, enquanto que os seus sais são solúveis em água (Smith e Hong-Shum, 2003). Embora o ácido benzóico seja o conservante mais eficaz, o seu sal de sódio é mais utilizado como aditivo em alimentos, devido à sua solubilidade aumentada em meios com elevado teor de água. As propriedades de ambos os compostos encontram-se descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Propriedades físico-químicas do ácido benzóico e do benzoato de sódio (WHO, 2000; Weller, 2006)

Propriedade	Ácido Benzóico	Benzoato de Sódio
Estrutura Química		
CAS n.º	65-85-0	532-32-1
Fórmula Molecular	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> CO <sub>2</sub> H	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> Na
M/(g/mol)	122,13	144,11
$\rho$ /(g/cm <sup>3</sup> ) (a 24 °C)	1,311	1,497-1,527
pKa (a 25 °C)	4,19	-
Descrição	Pó branco e cristalino	Pó branco e cristalino
Solubilidade a 20 °C em H <sub>2</sub> O	2,9 g/L	550-630 g/L
Odor	Inodoro	Inodoro

Eles são produzidos através de síntese orgânica no laboratório, mas o ácido benzóico ocorre naturalmente em groselha, framboesas, ameixas, canela, e cravos e em produtos de origem animal tais como leite mas em níveis não superiores a 40 mg/kg (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2003; Zacharis e Tzanavaras, 2013).

A utilização de benzoato de sódio como conservante tem sido ótimo para alimentos e bebidas com pH inferior a 4,5. A inibição do crescimento é fortemente dependente do pH, sendo mais eficaz em condições ácidas. Sob estas condições, a forma do ácido encontra-se predominantemente protonada (Visti *et al.*, 2003).

O sal benzoato de sódio também é mais eficaz em sistemas alimentares onde  $\text{pH} \leq 4$ , embora esteja associado principalmente com a preservação de sumos de frutas e frutos sucos (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2003; Suhr e Nielsen, 2004). Neste caso, é aplicado primariamente como um agente antifúngico (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2003). O benzaldeído e o álcool benzóico são inibidores de leveduras. O ácido benzóico é também, frequentemente usado em combinação com o ácido sórbico em muitos tipos de produtos. Esta combinação é particularmente popular nos produtos de confeitaria (Suhr e Nielsen, 2004).

Os derivados de benzoatos e parabenzoatos são utilizados principalmente em sumos de frutas, xarope de chocolate, recheios de tortas, legumes em conserva e queijo (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2003).

O ácido benzóico possui o estatuto de GRAS e é degradado no fígado para produzir benzoilglicina (ou ácido hipúrico), sendo este composto excretado na urina (Piper, 1999).

O mecanismo da sua ação antimicrobiana baseia-se na absorção pela célula em que a fermentação anaeróbica da glucose através da fosfofrutoquinase é reduzida em 95 %. Esta ação resulta na inibição do crescimento microbiano que provoca a deterioração dos alimentos (Krebs *et al.*, 1983). Exemplos típicos de alimentos onde são utilizados: bebidas alcoólicas com  $TAV < 15\%$ , sumos de frutas, bebidas aromatizadas à base de água, café, sobremesas à base de leite, frutos secos, vinagre, óleos ou salmoura, gomas, doces, etc. (GSFA, 2012).

Os benzoatos têm atividade contra leveduras e bolores. Os benzoatos não são recomendados para o controlo de bactérias, porque a sua atividade antimicrobiana é pobre acima de pH 4, onde as bactérias são o maior problema (Somogyi, 2006).

### Dicarbonato de Dimetilo (DMDC)

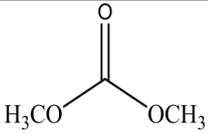
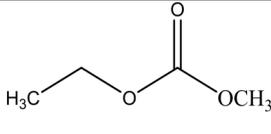
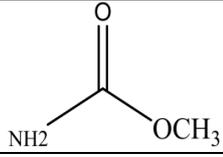
O dicarbonato de dimetilo (DMDC) é um agente de controlo microbiano que tem vindo a ser usado no com cada vez mais frequência na indústria do vinho (Ough, 1993a). Nos EUA e na Europa o limite máximo permitido para a sua aplicação é de 200 mg/L. A sua eficácia depende da estirpe, da concentração inicial de células, da temperatura, do pH e do teor de etanol (Costa *et al.*, 2008).

Embora seja eficaz, a aplicação do DMDC tem problemas de formulação e de dosagem. Em primeiro lugar, o produto químico é apenas moderadamente solúvel em água e exige uma mistura completa

para assegurar uma distribuição uniforme em vinhos ao serem engarrafados. Devido a estas limitações, a utilização adequada deste produto requer um aparelho de doseamento para garantir a homogeneização do produto e a consequente eficiência de inativação (Costa *et al.*, 2008). A sua aplicação deve obedecer às seguintes normas: a adição deve ser efetuada pouco antes do engarrafamento; o tratamento pode apenas ser aplicado a vinhos com teor de açúcares superior a 5 g/L e o produto não deve ser detetável no vinho quando colocado no mercado.

O DMDC é muito reativo com agentes nucleófilos contendo um átomo de hidrogénio ativo isto é, água, álcoois, ácidos carboxílicos, fenóis, aminas e grupos tiol. A reação predominante do DMDC em solução aquosa é a sua hidrólise com a formação de metanol e dióxido de carbono. Na presença de etanol ou outros compostos orgânicos (aminas, açúcares, ácidos), os principais produtos da reação que se formam são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Propriedades físico-químicas, hidrólise e identificação de produtos da reação de DMDC (EFSA, 2015; OIV, 2013; LanXESS, 2014)

DMDC						
	Descrição		Líquido incolor de odor ligeiramente penetrante			
	Ponto de solidificação		17 °C			
	Ponto de ebulição		172 °C, com decomposição			
	$\rho$		1,25 g/cm <sup>3</sup>			
	Espectro de infravermelho		Máximos de absorção a 1156 nm e 1832 nm			
	Cuidados de segurança		Corrosivo para pele e olhos. Tóxico em caso de inalação e ingestão.			
	Produtos da Hidrólise		Identificação de produtos da reação			
Fórmula química	CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> OH				
Designação	Dióxido de Carbono	Metanol	Carbonato de dimetilo	Monoetilcarbonato	Carbamato de metilo	
Fórmula molecular	CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> O	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	

A velocidade da hidrólise do DMDC é dependente da temperatura, sendo ideal a 20 °C com um período de meia vida de cerca de 17 min (Figura 7).

As bebidas com DMDC só podem ser consumidas depois de decorrida a sua hidrólise, *i.e.*, após o desaparecimento do DMDC.

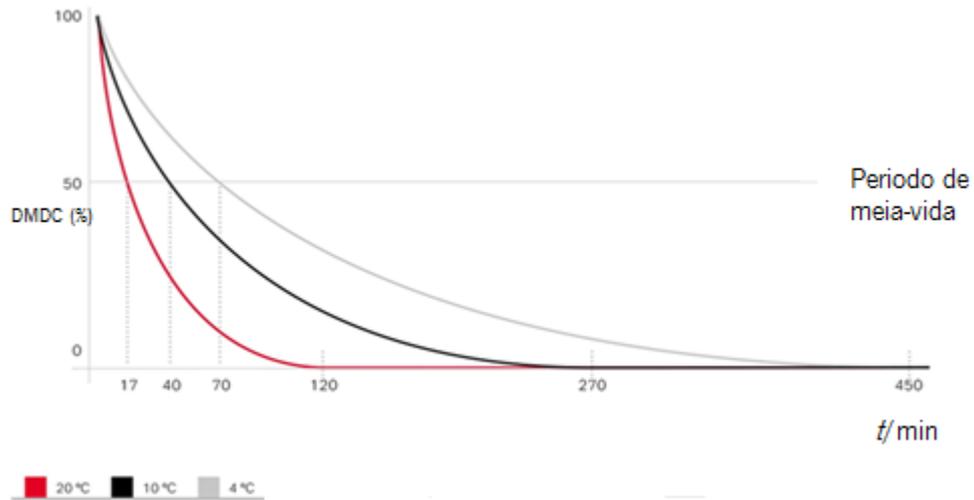


Figura 7 – Degradação do DMDC em contacto com bebidas em função do tempo de hidrólise ( $t$ ) (Adaptado de LanXESS, 2014).

A quantidade de DMDC a usar deve ser em função da quantidade de açúcar presente no vinho (LanXESS, 2014). Assim, para um vinho que contenha um baixo teor de açúcares (< 4 g/L) é recomendada uma adição entre os 75 mg/L e os 125 mg/L de DMDC; já para vinhos cuja quantidade de açúcar seja alta (> 45 g/L), a empresa Velcorin recomenda uma adição na ordem dos 125 mg/L a 200 mg/L. Nos vinhos tintos, não filtrados, é ainda recomendada a adição de 150 mg/L a 200 mg/L de DMDC.

O efeito antimicrobiano do DMDC resulta da inativação de enzimas microbianas (Ough, 1993a). Porter e Ough (1982) referiram que o seu mecanismo de ação é a desnaturação das enzimas via fermentativa, nomeadamente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a álcool desidrogenase (Figura 8).

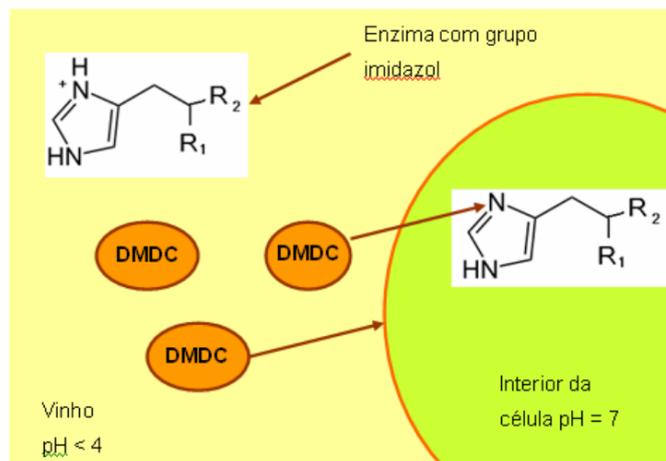


Figura 8 – Mecanismo de ação do DMDC (LanXess, 2014).

Segundo Ough *et al.* (1988) e Delfini *et al.* (2002) as bactérias lácticas são mais resistentes ao DMDC do que as leveduras. Assim, o uso de DMDC na dose máxima permitida, pode ser considerado como um conservante eficiente no controlo de contaminações de leveduras, mas ineficaz no controlo de bactérias lácticas e acéticas, pois para evitar o seu crescimento são necessários mais de 1000 mg/L, o que excede a concentração máxima permitida pelo Reg. (UE) n.º 606/2009 (Costa *et al.*, 2008; Delfini *et al.*, 2002).

Na Tabela 7 estão presentes as concentrações mínimas letais ( $C_{letal}$ ) para eliminar leveduras, bactérias acéticas e lácticas numa concentração celular (como unidades formadoras de colónias – UFC) igual a 500 mL<sup>-1</sup>.

Tabela 7 – Concentração mínima letal ( $C_{letal}$ ) de DMDC para UFC = 500 mL<sup>-1</sup> (Costa *et al.*, 2008; LanXess, 2009; Ough, 1993a)

Microrganismos	$C_{letal}$ /(mg/L)
<b>Leveduras</b>	
<i>Candida krusei</i>	100 a 200
<i>Botrytis cinerea</i>	100
<i>Brettanomyces</i> spp.	<50
<i>Saccharomyces bayanus</i>	120
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
<i>Saccharomyces uvarum</i>	20
<i>Schizosaccharomyces</i>	100
<i>Zygosaccharomyces</i>	50 a 150
<i>Hansenula anomala</i>	25 a 50
<i>Kloeckera apiculata</i>	25 a 50
<i>Rhodotorula</i> spp.	30 a 200
<i>Torulopsis</i> spp.	75 a 100
<b>Bactérias acéticas</b>	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	80
<i>Acetic acid bacterium</i>	>300
<b>Bactérias lácticas</b>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	200
<i>Lactobacillus buchneri</i>	30
<i>Oenococcus oeni</i>	>300

Renouf *et al.*, (2008) sugeriram que o DMDC não deve ser utilizado como um agente preventivo mas apenas como agente curativo contra populações indesejadas já presentes em vinho.

#### 2.2.4.2 Meios físicos

Na ausência de dióxido de enxofre ou DMDC, os vinhos engarrafados só podem ser estabilizados contra o crescimento microbiano por meios físicos, isto é, a pasteurização, a esterilização através da filtração e o processamento por altas pressões (Jackson, 2008).

## Filtração

A remoção das partículas pode ser realizada por macro ou microfiltração. A microfiltração tem sido tradicionalmente realizada utilizando filtros de terras de diatomáceas ou por filtração em almofada, enquanto que a filtração estéril pode ser alcançada através da utilização de membranas (0,22 µm). Ao longo dos anos, desenvolveram-se tecnologias de fluxo transversal, com capacidade para remover as partículas, que vão desde macromoléculas coloidais a espécies iónicas. A microfiltração é a separação de partículas de tamanho submicrométrica (> 0,2 µm) e é o sistema mais comum utilizado. A filtração esterilizante requer a utilização de membranas de porosidade suficiente para remover microrganismos. Apesar de serem recomendadas utilizar membranas com tamanhos de poros menores que 0,45 µm (por exemplo, 0,2 µm), a filtração é muito lenta e não é economicamente viável (Fugelsang e Edwards, 2007).

## Pasteurização

O tratamento térmico em vinhos pode ser realizado de várias formas, sendo o objetivo final, a eliminação de microrganismos prejudiciais e, por conseguinte, a sua estabilização. Existem 4 técnicas associadas a este tratamento térmico, nomeadamente, a pasteurização, a pasteurização *flash*, a pasteurização em garrafa (Túnel) e o engarrafamento a quente (Termolização).

A pasteurização compreende a passagem do vinho por um permutador de serpentina, passando água quente em contracorrente a temperaturas entre 60 e 65 °C durante 1 min. Depois ocorre o seu arrefecimento até à temperatura ambiente à saída do permutador, em contracorrente com vinho frio, poupando energia (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). A pasteurização *flash* consiste em aquecer o vinho durante alguns segundos a 90 °C e arrefecê-lo rapidamente graças a um trocador de calor de placas de alto rendimento (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Na pasteurização em garrafa (Túnel), o vinho já engarrafado é introduzido num túnel e aquecido por imersão de água quente, havendo por isso uma elevação da temperatura até 55 °C a 60 °C. Depois a água é retirada e o vinho em garrafa arrefece até à temperatura ambiente. O engarrafamento a quente (Termolização) é uma técnica que consiste em aquecer o vinho a uma temperatura entre 50 °C e 55 °C, eliminando os microrganismos, sendo o vinho quente diretamente transferido para a garrafa, assegurando ao longo do arrefecimento espontâneo, a esterilização do vidro e da rolha (Ezequiel, 2010).

Apesar de permitir a eficaz estabilidade microbiológica dos vinhos, o tratamento térmico levanta questões ao nível da sua influência na qualidade organolética. Adicionalmente, a pasteurização pode

afetar o título alcoométrico volúmico, o pH, os teores de  $\text{SO}_2$ , despoletar a desnaturação de proteínas e pode provocar um acastanhamento nos vinhos (Ezequiel, 2010).

Segundo Flanzky *et al.* (1998), para se obter a eliminação dos microrganismos presentes num vinho, através da pasteurização, é necessário ter em conta dois fatores: a temperatura de pasteurização e o tempo da aplicação do tratamento. Estes dois fatores estão definidos numa Unidade de Pasteurização (*UP*), que corresponde a um aquecimento com a duração de 1 min a uma temperatura de 60 °C. Fixando um tempo de 1 min, o número de *UPs* aplicadas a um vinho vai aumentar em função da temperatura.

## 2.3 Controlo de Qualidade de Produtos Vitivinícolas

Em geral, existem dois tipos de métodos para avaliar a qualidade dos alimentos: o objetivo e o subjetivo. A avaliação da qualidade objetiva inclui a análise instrumental, que pode ser muito benéfica, uma vez que é repetitiva e reprodutível e não é subjetiva, e sobretudo, o facto de que os instrumentos não sofrem de fadiga ou adaptação (Cozzolino e Damberg, 2010).

Os métodos subjetivos baseiam-se na avaliação humana das características de qualidade dos alimentos. Estes métodos geralmente envolvem a perceção de textura, sabor, odor e cor (Cozzolino e Damberg, 2010).

### 2.3.1 Análises Físico-químicas

#### 2.3.1.1 $\text{SO}_2$ livre e total

A quantificação do dióxido de enxofre ou anidrido sulfuroso realiza-se, porque é um elemento importante nos vinhos devido à sua ação dissolvente, antioxidante, antidiastásica e antissética. A forma  $\text{SO}_2$  ou forma molecular, é a que confere características antissépticas, já o conjunto  $\text{SO}_2 + \text{HSO}_3^-$  corresponde ao  $\text{SO}_2$  livre. É importante referir também que quando a concentração de  $\text{H}^+$  diminui, o pH aumenta, o que leva a que a concentração de  $\text{SO}_2$  molecular diminua. Além do pH, essa concentração depende da temperatura e do título alcoométrico volúmico. Daí ser importante determinar o  $\text{SO}_2$  livre e saber a sua disponibilidade (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

No método de análise deste parâmetro faz-se, inicialmente, um doseamento do dióxido de enxofre livre por titulação iodométrica direta, seguido do doseamento do dióxido de enxofre combinado por titulação iodométrica, após hidrólise alcalina.

### 2.3.1.2 Substâncias Redutoras e Açúcares Totais

A avaliação do nível de açúcares redutores representa um papel essencial para monitorizar e controlar a qualidade de um vinho, obtendo-se a informação acerca dos valores limite legais impostos e que são característicos do tipo de vinho que se pretende produzir. A quantidade de açúcares, além de classificar o vinho, permite conhecer a sua estabilidade e o risco de sofrer refermentação. A dose de SO<sub>2</sub> será também ajustada em função da sua concentração. Segundo o Regulamento (CE) n.º 2676/90 os açúcares redutores são constituídos por diferentes açúcares de função cetónica ou aldeídica e são doseados através da sua ação redutora sobre a solução cupro-alcalina. O método de medição tem como princípio a defecação do vinho com hexacianoferrato (II) de zinco, sendo posteriormente feita a reação com uma solução cuproalcalina, onde o excesso de iões cúpricos é doseado por iodometria indireta (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). No caso da sangria não é referido um limite da quantidade de açúcares adicionados.

### 2.3.1.3 pH

O conceito de pH, também conhecido como acidez verdadeira, o seu valor coincide bastante com a acidez, frequentemente associada à frescura ou mesmo "magreza", especialmente em vinhos brancos. O pH do vinho é medido utilizando um medidor de pH equipado com um eléctrodo de vidro após a calibração com duas soluções tampão. É vital verificar a temperatura (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

### 2.3.1.4 Acidez Total

Uma outra importante característica química dos mostos e dos vinhos está relacionada com a sua constituição ácida, sendo a acidez total um aspeto muito importante a nível organolético. Evidencia-se pela presença de todos os ácidos orgânicos e inorgânicos no vinho e até de alguns aminoácidos que possam ser tituláveis. A acidez total em mostos ou vinhos, também conhecida como "acidez titulável" é determinada por neutralização, usando uma solução de hidróxido de sódio de normalidade conhecida. O ponto final do ensaio é determinado através de um indicador, nomeadamente, o azul de bromotimol, que muda de cor a pH 7, ou a fenolftaleína, que muda de cor a pH 9. A acidez total também pode ser determinada com um eléctrodo de pH, que é o método mais fiável.

Na acidez total quantifica-se o ácido tartárico por ser o ácido orgânico maioritário em mostos e em vinhos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

### 2.3.1.5 Acidez Volátil

Os principais ácidos voláteis são o ácido acético, o propiónico e o butírico, que indicam a qualidade do vinho. O ácido acético é o principal componente de acidez volátil e é formado, principalmente durante a fermentação alcoólica. A determinação da acidez volátil em vinhos é importante, porque indica a possibilidade de contaminação do mesmo com microrganismos indesejáveis. Segundo o Reg. (UE) n.º 606/2009 os seus teores em vinhos não devem exceder 1,2 g/L. Para obter a acidez volátil de um vinho determina-se o teor de ácidos da série acética quer no estado livre, quer sob a forma de sais. Para esta determinação efetua-se uma destilação dos ácidos voláteis, separados por arrastamento com vapor de água num aparelho específico, Cazenave-Ferré, sendo depois titulados com uma solução de hidróxido de sódio (OIV, 2016; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

### 2.3.1.6 Título Alcoométrico Volúmico

O título alcoométrico volúmico (*TAV*) corresponde ao número de litros de etanol contido em 100 litros desse vinho, a 20 °C, e é representado em percentagem de volume (OIV, 2016). Este parâmetro é avaliado para verificar se está de acordo com o tipo de produto produzido e com os valores estipulados no Regulamento (UE) n.º 606/2009.

A determinação de *TAV* pode ser realizada utilizando vários métodos, nomeadamente, ebulimetria, destilação, picnometria, densitometria e cromatografia gasosa para determinação de álcoois. O método mais comum utilizado é por ebulimetria (Jacobson, 2006).

### 2.3.1.7 Massa Volúmica

A massa volúmica pode ser também definida como densidade da solução e representa a razão entre a massa de um determinado volume de vinho e o mesmo volume (OIV, 2016). Este parâmetro sofre alterações com as variações de temperatura. Este parâmetro é medido para auxiliar na monitorização de uma fermentação e é tido em conta no cálculo do extrato seco total.

### 2.3.1.8 Extrato Seco Total

Ao conjunto de substâncias que em determinadas condições físicas não se volatilizam dá-se o nome de extrato seco total ou matéria seca total. O extrato seco total é composto essencialmente por sais orgânicos e minerais, ácidos fixos, polialcoois, açúcares, compostos azotados, polissacáridos e compostos fenólicos. A determinação deste parâmetro permite detetar fraudes (adição de açúcar, etanol, etc.). É uma das características responsáveis pela estrutura e corpo do vinho. Para a sua

determinação são necessários os valores da acidez volátil, do título alcoométrico volúmico e da massa volúmica a 20 °C (OIV, 2016; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

### 2.3.1.9 Cor

A cor é medida porque afeta a percepção da qualidade, bem como do paladar. Esse parâmetro pode ser avaliado fazendo passar na amostra feixes de luz, de diferentes comprimentos de onda, nomeadamente 420 nm (absorve radiação azul, o que corresponde a uma tonalidade amarela do vinho), 520 nm (tonalidade vermelha) e 620 nm (tonalidade azul). A partir destes dados obtém-se a intensidade, tonalidade de cor e pigmentos amarelos, vermelhos e azuis em %. Outra forma de estimar a cor envolve o sistema CIELab (*Commission Internationale de l'Eclairage*). O sistema CIELab compreende a medição da transmissão de luz num intervalo de comprimentos de onda desejado. Estes dados podem ser usados para obter as coordenadas de cor do produto,  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (verde/vermelho),  $b^*$  (azul/amarelo),  $C^*$  (saturação) e  $H^*$  (tonalidade) (Jackson, 2002).

### 2.3.2 Análises Microbiológicas

As bebidas à base vinho não possuem microrganismos patogénicos, apenas podem conter microrganismos que causam a sua deterioração do aroma e/ou do sabor. Para evitar essa deterioração é essencial realizar análises microbiológicas de forma a conhecer os possíveis microrganismos que a podem causar. Os microrganismos que são indesejáveis nas bebidas são algumas leveduras, nomeadamente dos géneros *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, e algumas espécies dos géneros *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, entre outras, bactérias acéticas do género *Acetobacter* e algumas bactérias lácticas, nomeadamente *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus casei* (Osborne, 2010).

### 2.3.3 Análises Sensoriais

A análise sensorial é uma ciência utilizada para medir, relacionar, analisar e interpretar reações acerca das características dos alimentos e materiais tal como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, tato, sabor e audição (Stone e Sidel, 2004).

A análise sensorial para a indústria alimentar é relevante, dada às diversas aplicações que a mesma permite. A análise sensorial é utilizada para avaliar aspetos qualitativos de um produto nomeadamente, o aspeto, o sabor, o odor e o aroma e a textura. Este tipo de análise pode ser utilizada no desenvolvimento de novos produtos, reformulação dos produtos já estabelecidos no mercado, estudos

do tempo de prateleira, determinação das diferenças e semelhanças apresentadas entre produtos, identificação das preferências dos consumidores em relação a um determinado produto e, finalmente na otimização e melhoria da qualidade na produção.

Deste modo, as provas de avaliação sensorial devem ser sempre programadas de acordo com os objetivos que se pretende atingir (Kemp *et al.*, 2009).

### 2.3.3.1 Tipos de testes

As provas sensoriais podem ser do tipo descritivo, discriminativo e afetivo. No teste descritivo, os atributos de um produto são identificados e quantificados por provadores treinados especificamente para este propósito. Os testes discriminativos são testes objetivos e podem ser utilizados no controlo da qualidade, desenvolvimento de novos produtos e para testar a precisão e a confiabilidade dos provadores, indicando por comparações, se existem ou não diferenças estatísticas entre amostras. Os testes discriminativos ou de diferença mais empregues em análise sensorial são o triangular, o “A ou não A”, o duo-trio, a ordenação, a comparação pareada, o teste de diferenças da amostra controlo e o teste de diferenças e/ou semelhanças entre amostras. As provas afetivas ou testes de consumidores consistem na manifestação subjetiva do provador sobre a aceitação, gostos ou preferências em relação ao produto testado, demonstrando se tal produto agrada ou não agrada, se é aceite ou não e se é preferido, em relação a outro. Tem como intuito saber se o provador gosta e qual o produto que prefere. Pode recorrer-se a diferentes tipos de escalas, por exemplo escalas estruturadas de 5, 7 e 9 pontos (Kemp *et al.*, 2009).

### 2.3.3.2 Avaliação sensorial de vinhos

A qualidade organolética é um aspeto fundamental da qualidade global de vinhos (Lisanti *et al.*, 2010).

A qualidade de um vinho em termos de características sensoriais, é normalmente uma medida subjetiva realizada por enólogos experientes, ou por um painel de provadores de vinhos de competição ou degustação e envolve a medição, interpretação e compreensão das respostas humanas às propriedades percebidas pelos sentidos como visão, aroma e sabor (Cozzolino e Damberg, 2010).

### Cor

Exceto em raras situações, em que a cor não deve influenciar a avaliação sensorial, a cor de um vinho é a primeira componente a ser avaliada. Para melhorar a transmissão de luz, o copo deve ser inclinado

contra um fundo brilhante branco (35° a 45° de ângulo). Isto produz uma borda curva de diferentes profundidades, através da qual a aparência do vinho pode ser visualizada (Jackson, 2002).

### Aroma

De seguida vem a avaliação da componente aromática. É recomendado aos provadores cheirar o vinho antes de rodar o copo, para que sejam evidentes os compostos aromáticos mais voláteis presentes no vinho. Ao rodar são evidentes outros compostos, pois aumenta-se o contacto entre o oxigénio e o vinho. Depois de avaliar o aroma, devem-se fazer intervalos de cerca de 30 s a 60 s entre avaliações. No caso do aroma, normalmente são avaliados os descritores intensidade e persistência (Jackson, 2002).

A componente aromática de um vinho pode ser alterada devido à sua contaminação química ou microbiológica. Nestes casos, podem surgir compostos voláteis responsáveis por odores desagradáveis acima do seu limiar de perceção olfativo (Lisanti *et al.*, 2010).

Os *off-flavours* mais frequentes que podem surgir num vinho são os odores torrados provenientes da reação de *Maillard*, odor vegetal, aroma oxidado (acetaldeído), odor a batata cozida (metional), odores amanteigados (diacetilo), odor a “suor de cavalo”, entre outros (Jackson, 2002; Oliveira, 2010).

### Sabor

Por último avalia-se o gosto e a sensação de boca, fazendo com que o vinho se mantenha em contacto com todas as regiões da boca. Avalia-se as primeiras sensações de gosto, nomeadamente as de doçura e da acidez. É aconselhável manter o vinho na boca durante pelo menos 15 s. Posteriormente, o provador deve concentrar-se na sensação de boca, tais como na adstringência, nas perceções de calor (álcool ou sensações induzidas por fenol) e na presença de dióxido de carbono. Os taninos reagem com as proteínas na boca, diminuindo o seu potencial de sensações amargas e adstringentes. A reação com proteínas da saliva explica, parcialmente por que a primeira amostra é normalmente menos amarga e adstringente do que as amostras subsequentes, por isso, deve-se ingerir água ou bolachas de água e sal para não haver interferência entre análises. Outras perceções importantes correspondem ao equilíbrio e o corpo (Jackson, 2002).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em quatro etapas distintas. A primeira etapa corresponde à caracterização físico-química da sangria Casal Garcia, de sangrias já existentes no mercado, em Portugal e nos EUA, e de uma sangria desenvolvida na empresa no âmbito deste trabalho. Esta caracterização foi realizada para conhecer uma eventual coerência nos parâmetros de qualidade avaliados entre a sangria Casal Garcia e as sangrias presentes no mercado e ainda saber a gama de valores que definem este tipo de produto.

A segunda etapa incluiu a determinação do tempo de prateleira da sangria Casal Garcia através do ensaio de envelhecimento acelerado do produto com diferentes conservantes, avaliando parâmetros de qualidade, físico-químicos e microbiológicos. O tempo de prateleira foi calculado a partir de  $Q_{10}$  e de um fator de aceleração, que advêm da equação de Arrhenius.

A etapa seguinte refere-se ao controlo de qualidade físico-químico, microbiológico e sensorial de quatro lotes de sangria Casal Garcia engarrafada, com diferentes tempos de armazenamento (396 d, 356 d, 62 d, 31 d). Esta etapa foi realizada para verificar se as sangrias mais envelhecidas, apesar de não possuírem a mesma base vínica que as sangrias mais recentes, se se encontravam com qualidade satisfatória nos parâmetros avaliados. Além disso, este procedimento também serviu de auxílio na determinação do tempo de prateleira.

Por último, foram realizadas análises sensoriais, com diferentes tipos de testes, e análises físico-químicas de novas formulações de sangria desenvolvidas. A produção de novas formulações de sangria teve como intuito o teste da combinação de determinados ingredientes, nomeadamente, mel e canela, aroma de limão, gengibre, geleia de alfarroba, licor de pêssego e glicosídeos de steviol, bem como a avaliação da sua deteção e ainda a aceitabilidade e preferência dos produtos.

#### 3.1 Planeamento experimental

A Figura 9 resume, de forma esquemática, a amostragem global dos estudos efetuados nesta dissertação, incluindo as análises físico-químicas, sensoriais e microbiológicas, realizadas a sangrias comerciais, envelhecidas e desenvolvidas. As metodologias usadas estão detalhadas, posteriormente, nos subcapítulos 3.2. a 3.4.

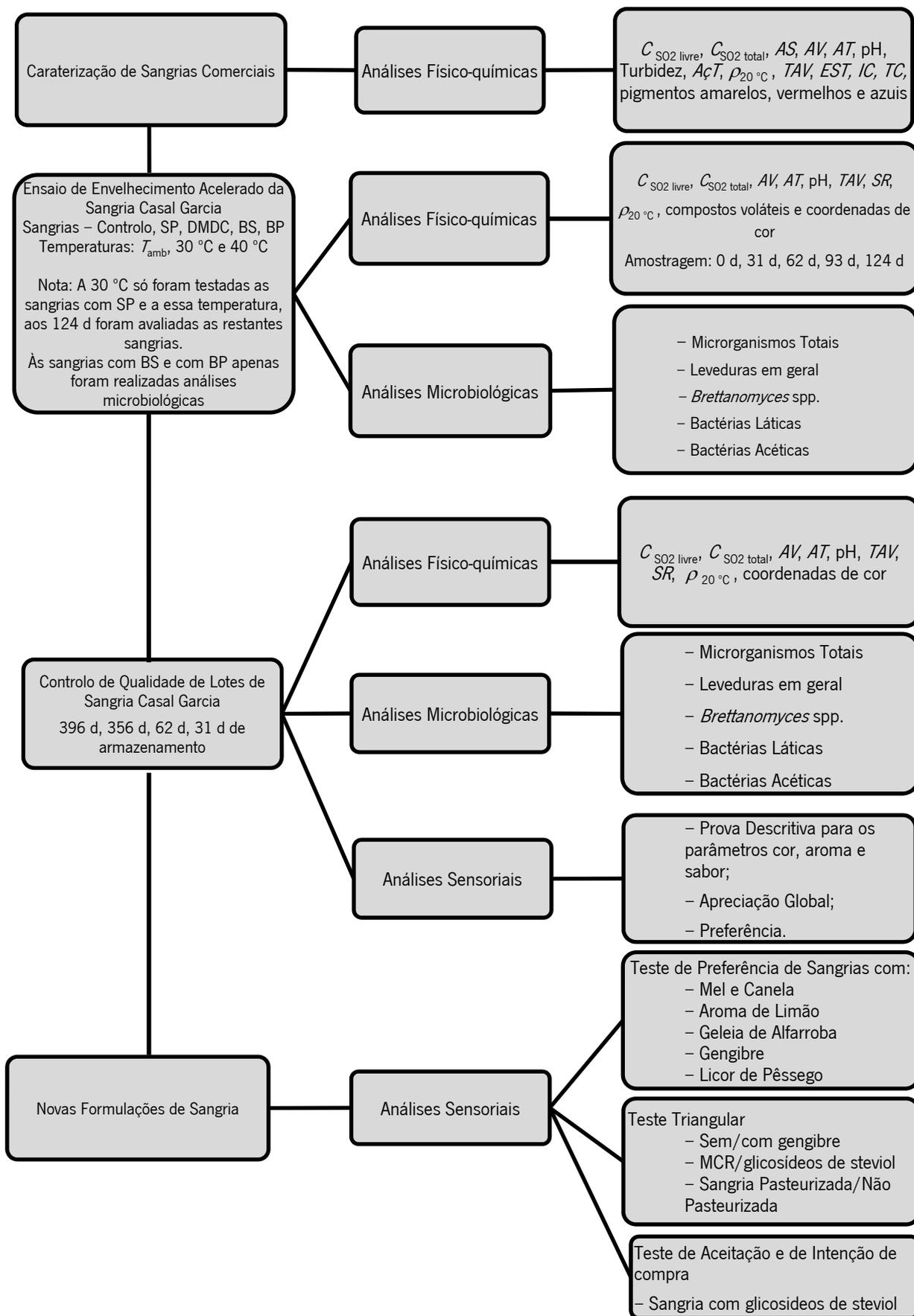


Figura 9 – Esquema que sintetiza o planeamento experimental no âmbito da presente dissertação.

### 3.1.1 Caracterização de Sangrias Comerciais

A primeira parte do trabalho consistiu na caracterização físico-química de sangrias tintas já comercializadas em Portugal (Marca 1 a 5), nos EUA (Marca 6 a 9), uma desenvolvida na empresa no âmbito deste trabalho, cuja formulação se encontra na Tabela 8 e ainda ao último lote produzido da sangria Casal Garcia (Marca 1), na altura. A idade e composição das sangrias comerciais eram desconhecidas. Apenas se sabia que a Marca 9 continha polpa de fruta.

Os parâmetros de qualidade físico-químicos avaliados foram as concentrações de SO<sub>2</sub> livre ( $C_{SO_2 \text{ livre}}$ ), de SO<sub>2</sub> Total ( $C_{SO_2 \text{ total}}$ ), por titulador automático, acidez volátil (*AV*), acidez total (*AT*), pH, turbidez, açúcar total (*AçT*), massa volúmica a 20 °C ( $\rho_{20^\circ C}$ ), título alcoométrico volúmico (*TAV*), extrato seco total (*EST*), intensidade (*I*) e tonalidade de cor (*TC*) e a quantidade percentual de pigmentos amarelos, vermelhos e azuis. O objetivo deste procedimento foi comparar a Sangria Casal Garcia com as sangrias comerciais de forma a verificar se haveria muita discrepância nos parâmetros analisados. Foi ainda essencial efetuar uma pesquisa dos conservantes utilizados nas sangrias comerciais, através da determinação de Ácido Sórbico (*AS*).

Tabela 8 – Ingredientes, título alcoométrico volúmico (*TAV*) e açúcar total (*AçT*) de uma nova formulação de sangria

Ingredientes		<i>TAV</i> /%	<i>AçT</i> /(g/L)
Vinho Tinto	1,5 L		
Vinho Rosado	3,5 L		
Mosto Concentrado Retificado (MCR)	0,39 g		
H <sub>2</sub> O desionizada	0,25 L		
Mel	50 g	9,76	69,3
Canela em pó	0,5 g		
Aguardente Vinica	0,1 L		
Ácido Cítrico	1,7 g		
Sorbato de Potássio	1,1 g		

O mel e a canela em pó foram dissolvidas em 250 mL de água desionizada, o conjunto foi filtrado em papel de filtro e, posteriormente, pasteurizado a 90 °C durante 10 min. Neste preparado depois de filtrado também foram adicionados ácido cítrico e sorbato de potássio para que fossem mais facilmente dissolvidos. Só depois foram adicionados os vinhos tinto e rosado, o mosto concentrado retificado (MCR) e a aguardente vinica.

Depois de bem dissolvido, o preparado global foi filtrado em vácuo, com uma membrana de acetato de celulose e nylon com 0,45 µm de porosidade.

### 3.1.2 Ensaio de Envelhecimento Acelerado da Sangria Casal Garcia

De forma a determinar o tempo de prateleira, a Sangria Casal Garcia foi sujeita a um envelhecimento acelerado ao longo de 124 d a diferentes temperaturas, nomeadamente  $T_{amb}$  (temperatura à volta de 20 °C), 30 °C e 40 °C (em estufas). Foram ainda testados diferentes conservantes em concentrações de 200 mg/L, particularmente, o sorbato de potássio (SP), o benzoato de sódio (BS), o benzoato de potássio (BP) e o dicarbonato de dimetilo (DMDC). O ensaio de controlo consistiu numa sangria padrão sem adição de qualquer conservante (controlo). A aplicação do DMDC à sangria foi realizada numa hotte, com os devidos cuidados de segurança (luvas, máscaras e óculos de proteção). A temperatura de 30 °C foi apenas testada nas sangrias com SP, em todos os tempos, e no último tempo (124 d) apenas para as sangrias controlo e DMDC. Isto sucedeu-se, pelo facto de o SP ser o conservante utilizado na sangria Casal Garcia.

O estudo foi realizado em garrafas de 375 mL devidamente esterilizadas a 180 °C em estufa. As sangrias para o envelhecimento foram filtradas a 1 µm com membrana industrial de placas de celulose e engarrafadas na zona de tanques de armazenamento da Aveleda, local onde se encontram os lotes de sangria para engarrafar (zona de rede de frio). As sangrias, em estudo, corresponderam à formulação da Sangria Casal Garcia, variando apenas o conservante. O edulcorante utilizado foi o mosto concentrado retificado (MCR). A sangrias tinham também na sua composição um aroma cítrico da Marca Firmenich.

Às sangrias do ensaio de envelhecimento foram realizadas análises físico-químicas, em triplicado (3 garrafas), de mês a mês (0 d, 31 d, 62 d, 93 d e 124 d), sendo os parâmetros avaliados, a concentração de SO<sub>2</sub> livre ( $C_{SO_2 \text{ livre}}$ ), a concentração de SO<sub>2</sub> total ( $C_{SO_2 \text{ total}}$ ), a acidez volátil ( $AV$ ), a acidez total ( $AT$ ), o pH, o Título alcoométrico volúmico ( $TAIV$ ), as substâncias redutoras ( $SR$ ), a massa volúmica a 20 °C ( $\rho_{20 \text{ °C}}$ ), as coordenadas de cor e os compostos voláteis. Para fazer a quantificação dos compostos voláteis, as amostras de sangria foram congeladas a -20 °C, nos tempos de amostragem das análises físico-químicas, até ao momento da análise. Foram quantificados os compostos voláteis das amostras mantidas a  $T_{amb}$  e a 40 °C.

Foram ainda realizadas análises microbiológicas às sangrias do ensaio de envelhecimento, em duplicado, aos indicadores microrganismos totais, leveduras em geral, leveduras do género *Brettanomyces*, bactérias lácticas e bactérias acéticas. As sangrias tratadas com benzoato de sódio e benzoato de potássio apenas foram avaliadas através de análises microbiológicas nos tempos 15 d, 31 d, 62 d, 93 d e 124 d. Nestas sangrias, no indicador de leveduras, além do método de diluições usou-se a filtração esterilizante. Nas restantes sangrias, isto é, a de controlo, com SP e com DMDC, a

amostragem da análise microbiológica foi aos 15 d, 31 d e 124 d. Também foram avaliados os ingredientes que foram utilizados nas sangrias de envelhecimentos (vinho rosado + tinto, água e MCR). No caso do ingrediente água, no indicador microrganismos totais, além do método por diluições sucessivas, recorreu-se à avaliação através da filtração esterilizante com membranas de acetato de celulose e nylon usando 250 mL de água.

A determinação do tempo de prateleira da Sangria Casal Garcia foi obtida a partir de  $Q_{10}$  e de um fator de aceleração ( $FA$ ) que advém da Equação de Arrhenius.

### 3.1.3 Controlo de Qualidade de Lotes de Sangria Casal Garcia

Foi realizado um controlo de qualidade de 4 lotes de sangria Casal Garcia a nível físico-químico, sensorial e microbiológico. Os lotes possuíam diferentes tempos de armazenamento, nomeadamente 396 d, 356 d, 62 d e 31 d. Os lotes com 396 d e 356 d são de 2015 e os restantes são de 2016.

Relativamente às análises físico-químicas, estas tiveram por base o controlo da existência de fermentação, através da avaliação dos seguintes parâmetros  $TAV$ ,  $SR$ ,  $\rho_{20\text{ }^\circ\text{C}}$ , pH,  $AT$ ,  $AV$ ,  $C_{\text{SO}_2 \text{ livre}}$ ,  $C_{\text{SO}_2 \text{ total}}$  e coordenadas de cor. Nos parâmetros  $C_{\text{SO}_2 \text{ livre}}$  e  $C_{\text{SO}_2 \text{ total}}$  obtidos foi elaborada uma comparação com os valores presentes no registo do engarrafamento da Aveleda para os lotes com 396 d e 356 d de armazenamento.

As análises sensoriais utilizadas foram uma prova descritiva, incluindo uma apreciação global e um teste de preferência por ordenação, para verificar se apenas os lotes mais recentes eram os mais prediletos. Na prova descritiva também foi solicitado aos provadores para selecionarem a partir de uma lista, presente na folha de prova, os aromas que conseguiram detetar nos 4 lotes.

As análises microbiológicas foram realizadas, em duplicado, apenas aos lotes com 396 d e com 356 d. No âmbito destas análises foram avaliados microrganismos totais, leveduras em geral, leveduras do género *Brettanomyces*, bactérias lácticas e bactérias acéticas. Foi ainda elaborado um controlo microbiológico a sangrias produzidas no laboratório da Aveleda, nomeadamente a uma sangria de um ensaio com 582 d (agosto de 2014) e de sangria da formulação Casal Garcia filtrada a 0,22  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$  com a adição de sorbato de potássio. A sangria do ensaio com 582 d foi elaborada na Aveleda, para efeitos de otimização de formulação e definição do tempo de prateleira.

### 3.1.4 Novas Formulações de Sangria

Todas as sangrias foram produzidas e engarrafadas no laboratório da Aveleda. Antes de serem engarrafadas foram filtradas em vácuo com membranas de acetato de celulose e nylon com porosidade de 0,45 µm. Foram utilizadas garrafas de vidro transparente de 1,5 L de capacidade.

De forma a introduzir novos ingredientes permitidos no Regulamento (UE) n.º 251/2014, foram desenvolvidas 5 formulações tendo como base a formulação da Sangria Casal Garcia original. Os novos ingredientes adicionados estão definidos na Tabela 9. As formulações foram submetidas a um teste de preferência por ordenação.

Tabela 9 – Formulações de sangria utilizadas num teste de preferência por ordenação

Formulação	Ingredientes adicionais
1	Licor de pêsego Schnapps (10 mL/L) Aguardente Vinica da Aveleda (4 mL/L)
2	Geleia de alfarroba Caseira (7,5 g/L) Aguardente Vinica da Aveleda (4 mL/L)
3	Aroma de Limão Firmenich (2 gotas de aroma diluído) Aguardente Vinica da Aveleda (5 mL/L)
4	Gengibre em pó “Celeiro Dieta”(0,01 g/L) Aguardente Vinica da Aveleda (5 mL/L)
5	Mel “Amigos do Rio Este”(4,2 g/L) Canela em pó “Margão” (0,04 g/L) Aguardente Vinica da Aveleda (8,3 mL/L)

A sangria da formulação 3 foi ainda sujeita a um teste triangular para verificar se o ingrediente gengibre em pó era detetável, relativamente a sangrias com a ausência desse ingrediente.

#### 3.1.4.1 Sangrias com glicosídeos de steviol

Foi ainda desenvolvida uma sangria com glicosídeos de steviol, de *Stevia rebaudiana*, da marca Biosamara Iberia, com base na formulação base da Casal Garcia. A sangria foi sujeita a um teste de aceitação e de intenção de compra. A sangria possuía 16,74 g de glicosídeos de steviol com 98 % de pureza e Eritritol (2 %), o que corresponde a 70 g de mosto concentrado retificado.

Além desta sangria, também foi produzida uma outra, com maior quantidade de glicosídeos de steviol (23,92 g/L). Esta sangria foi sujeita a um teste triangular, juntamente com uma sangria com a mesma base vínica, mas com mosto concentrado retificado (100 g/L). O objetivo do teste era verificar se era perceptível a diferença em relação ao edulcorante. A estas sangrias também foi calculado *EST*. Na

Tabela 10 encontram-se os ingredientes e a respetiva quantidade das formulações de sangria em prova.

Tabela 10 – Ingredientes e características das formulações de sangria com MCR e com glicosídeos de steviol que foram utilizadas para o teste triangular

Ingredientes e Características	Formulação com MCR	Formulação com glicosídeos de steviol
Vinho Rosado	1,5 L	1,5 L
Vinho Tinto	3,5 L	3,5 L
Água	1,3 L	2,05 L
Edulcorante	0,75 (mL/L)	23,92 (g/L)
<i>TAV</i>		8,32 %
<i>SR</i>	100 g/L	100 g/L

### 3.1.4.2 Sangria Pasteurizada

De forma a verificar se era detetável a presença de pasteurização numa sangria, testou-se num teste triangular uma sangria pasteurizada e não pasteurizada do mesmo lote. O binómio temperatura/tempo utilizado foi de 60 °C durante 20 min para inativar os microrganismos indesejáveis (Briggs *et al.*, 2004). A pasteurização foi realizada em banho termostatizado com garrafas devidamente fechadas com *screw cap* e com parafilme em volta da zona de abertura, para que servisse de barreira acrescida. O tempo para atingir os 60 °C foi medido antecipada e manualmente e foi tido em conta no processamento. A sangria demorou 18 min a atingir os 60 °C.

Às sangrias pasteurizada e não pasteurizada foram ainda avaliados os seguintes parâmetros:  $C_{SO_2 \text{ livre}}$ ,  $C_{SO_2 \text{ total}}$ , *TAV*, *SR*, *EST* e coordenadas de cor.

## 3.2 Análises físico-químicas

As metodologias usadas nas análises físico-químicas para alcançar as etapas discriminadas na Figura 9, são descritas nos subcapítulos 3.2.1 a 3.2.12.

### 3.2.1 Preparação da amostra

Antes de se proceder à realização das análises físico-químicas, à exceção da determinação do SO<sub>2</sub> livre e SO<sub>2</sub> total e dos compostos voláteis, procedeu-se à remoção do dióxido de carbono. Para o efeito introduziram-se cerca de 200 mL de sangria num frasco *Erlenmeyer* e, de seguida, procedeu-se à sua agitação sob vácuo provocado por uma bomba (Figura 10), durante 10 min.

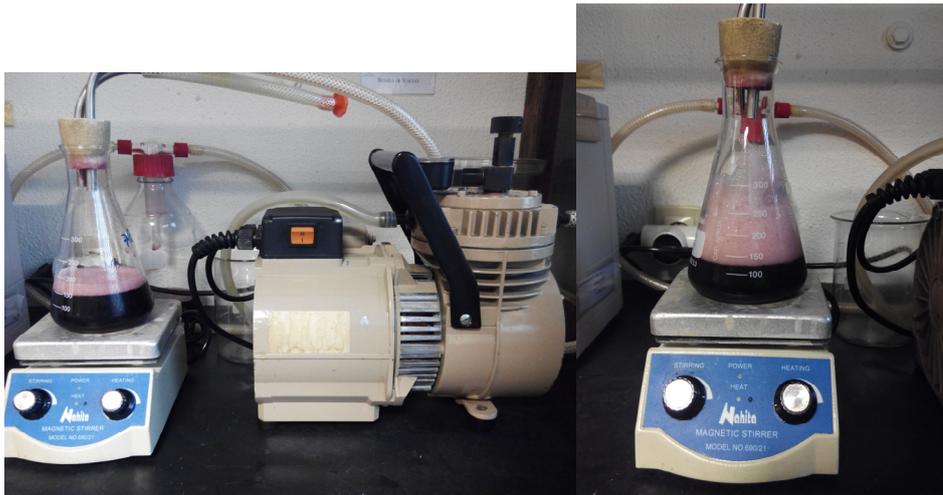


Figura 10 – Remoção de dióxido de carbono da sangria através de uma bomba de vácuo.

### 3.2.2 Determinação do SO<sub>2</sub> Livre e do SO<sub>2</sub> Total

A determinação do SO<sub>2</sub> foi realizada com base no método de *Ripper* utilizando um titulador automático e uma titulação manual.

#### 3.2.2.1 Método de Ripper

##### Titulador Automático

Para a quantificação do SO<sub>2</sub> livre ( $C_{SO_2 \text{ livre}}$ ) e do SO<sub>2</sub> Total ( $C_{SO_2 \text{ total}}$ ) foi utilizado um titulador automático *CRISON Matic 23* com um eletrodo de SO<sub>2</sub> dedicado à análise de vinhos (Figura 11).



Figura 11 – Titulador automático *CRISON Matic 23* (A) com eletrodo de SO<sub>2</sub>, dedicado à análise de vinhos (B).

No caso do SO<sub>2</sub> livre, colocaram-se 10 mL de sangria de uma garrafa por encetar num tubo de análise juntamente com uma barra magnética. Por fim, colocou-se o tubo no agitador do equipamento, e fez-se a leitura na opção “analisar SO<sub>2</sub> livre”. Devido à existência de interferentes na sangria, adicionou-se 1 mL de solução de acetaldeído (7 g/L) e efetuou-se nova leitura, num novo tubo. A esse resultado subtraiu-se o valor da leitura da análise direta (sem acetaldeído). Entre amostras, de cada determinação, procedeu-se à lavagem do eletrodo com água desionizada. Relativamente à quantificação de SO<sub>2</sub> total, o procedimento foi o mesmo, carregando na opção “analisar SO<sub>2</sub> Total”.

### Titulação manual

Para a avaliação da concentração de SO<sub>2</sub> livre, pipetaram-se 25 mL de sangria para um balão *Erlenmeyer*, a partir de uma garrafa por encetar. Adicionaram-se 5 mL de ácido sulfúrico a 25 % e cerca 2 mL de goma de amido (10 g/L). Posto isto, titulou-se, imediatamente, com iodo 0,02 mol/L até que a coloração azul (com auxílio de lâmpada posterior), a princípio fugaz, persistisse durante 10 s a 15 s (cor mais acentuada no caso do vinho tinto/sangria – Figura 12).



Figura 12 – Amostra de sangria antes (à esquerda) e depois (à direita) da titulação iodométrica.

Para o SO<sub>2</sub> total, repetiu-se o mesmo procedimento com a sangria da mesma garrafa, adicionando 10 mL ácido sulfúrico a 25 % e 10 mL de hidróxido de potássio 10 mmol/L, num balão *Erlenmeyer* fechado, que foi mantido fechado com rolha de borracha, durante 10 min, antes de titular.

Dado que certas substâncias são oxidadas pelo iodo em meio ácido, é necessário avaliar a quantidade de iodo consumido nessas oxidações. Para isso, é necessário combinar o anidrido sulfuroso livre com um excesso de acetaldeído, antes da titulação. Neste trabalho de dissertação utilizou-se um método prático que consistiu em adicionar 25 mL de sangria e 2 gotas de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 10 %. Agitou-se, e, seguidamente, titulou-se pelo mesmo procedimento do SO<sub>2</sub> livre. O valor obtido foi deduzido ao SO<sub>2</sub> livre e total lidos sem a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No anexo I está presente uma Tabela I.1 com

a correspondência do volume gasto de iodo e o valor de  $\text{SO}_2$  obtido (valor tabelado deve ser multiplicado por 1000).

### 3.2.3 Determinação do pH e da Acidez Total

O pH e a acidez total (*AT*) foram determinados por um potenciômetro da marca *Crison pH Matic 23* (Figura 13). Primeiramente efetuou-se a calibração do aparelho, segundo indicações do fabricante. A medição de pH foi baseada no método OIV-MA-AS313-01:R2015. Por outro lado, o valor de *AT* foi obtido através da titulação potenciométrica até pH 7 com NaOH (0,5 mol/L). Para a medição destes parâmetros foram utilizados 10 mL de sangria.

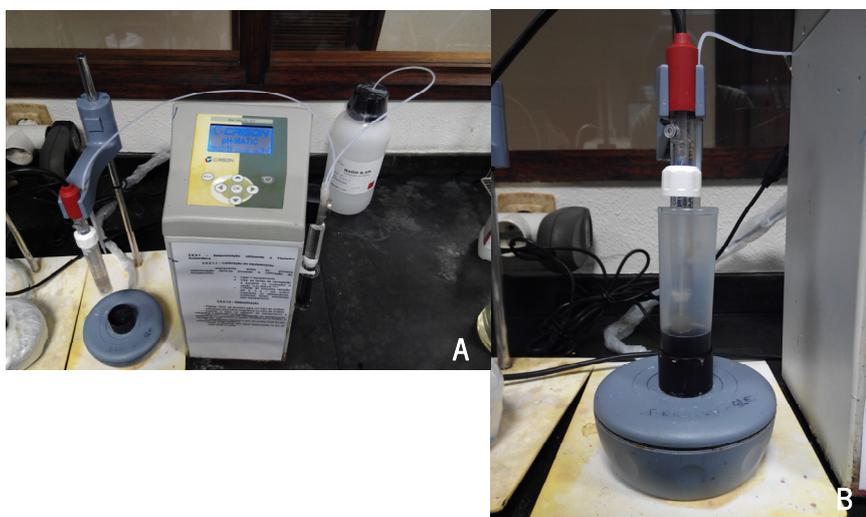


Figura 13 – Titulador automático *CRISON pH - Matic 23* (A) e eletrodo e dispensador de NaOH (B).

### 3.2.4 Determinação da Acidez Volátil

O procedimento para a determinação da acidez volátil foi baseado na Norma Portuguesa (NP 2140) e adaptado do método OIV-MA-AS313-02:R2015.

O método envolve uma destilação e, posteriormente, uma titulação. Para a destilação, introduziram-se no gerador de vapor, 600 mL de água destilada (Figura 14) e no borbulhador, 10 mL de sangria com sensivelmente 1 g a 2 g de ácido tartárico em grão e fez-se circular água no circuito de refrigeração.

Num balão *Erlenmeyer* recolheu-se 100 mL de destilado.

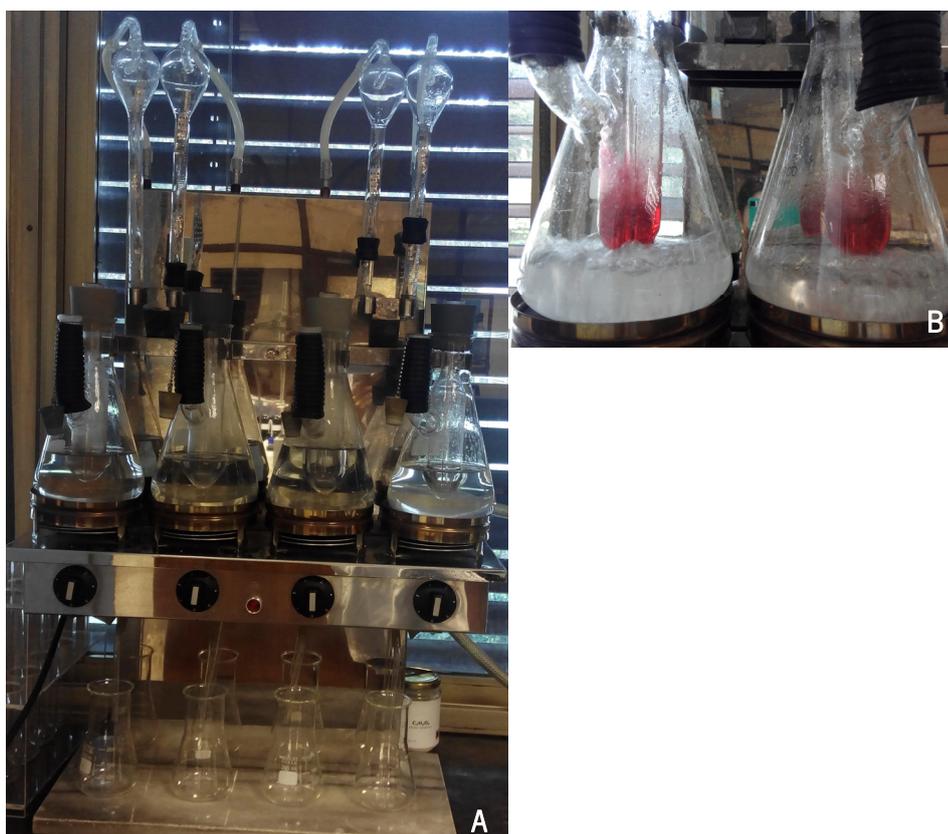


Figura 14 – A,B - Aparelho de destilação por arrastamento de vapor, constituído por um gerador de vapor, tubo de destilação, dispositivo de retificação e de condensação.

Seguidamente, titulou-se o destilado com uma solução de NaOH 0,1 mol/L, utilizando-se a fenolftaleína como indicador, até obter uma coloração rosa-pálido (Figura 15A). O volume gasto de NaOH 0,1 mol/L corresponde a  $V_1$  da Equação 9. Posteriormente, adicionou-se uma gota de ácido clorídrico, 1 mL de solução de iodeto de potássio 10 % e 2 mL de goma de amido. Depois, titulou-se o  $\text{SO}_2$  livre com a solução de iodo 0,02 mol/L até atingir a coloração azul (Figura 15B) e anotou-se o volume gasto de solução,  $V_2$ . Por fim, juntou-se 20 mL de solução saturada de bórax, até a solução retomar a coloração rosa-pálido inicial, titulando-se novamente com a solução de iodo 0,02 mol/L, até readquirir a coloração azul (Figura 15C). O volume gasto nesta titulação corresponde a  $V_3$ .

A acidez volátil ( $AV$ ) é expressa às centésimas como ácido acético, e é determinada através da Equação 10:

$$\frac{AV}{\text{g/L}} = 0,6 \left[ V_1 - \left( \frac{V_2/\text{mL}}{5} + \frac{V_3/\text{mL}}{10} \right) \right] \quad (\text{Eq.10})$$

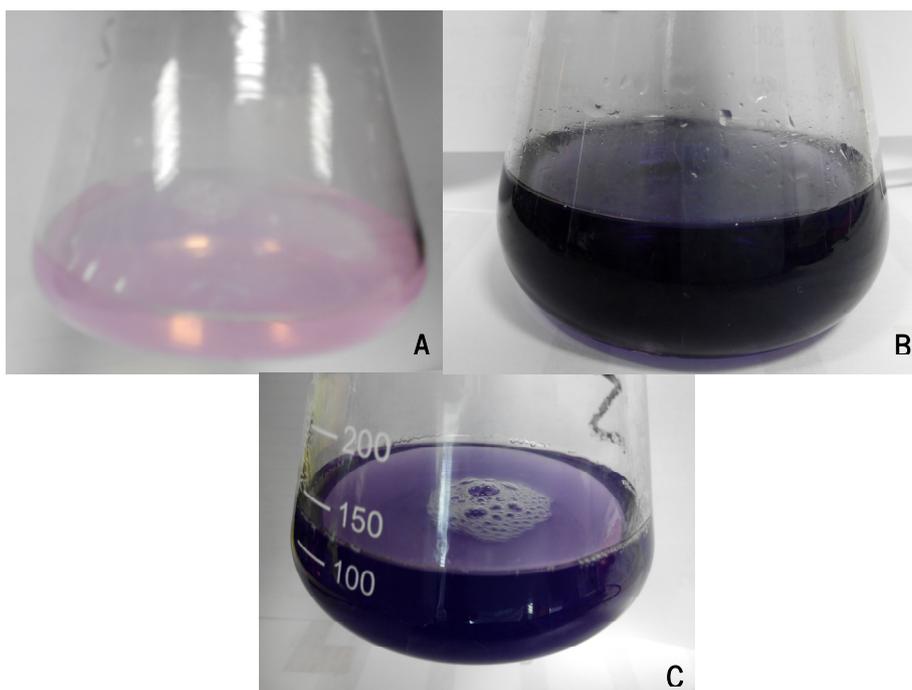


Figura 15 – Coloração da amostra após as 3 titulações (A – 1.ª Titulação; B – 2.ª Titulação; C – 3.ª Titulação).

### 3.2.5 Determinação de Açúcar Total e de Substâncias Redutoras

A determinação das substâncias redutoras ( $SR$ ) foi baseada no método OIV-MA-AS311-01A:R2009.

É importante referir, que o procedimento das substâncias redutoras foi realizado, periodicamente, para proceder à verificação de valores obtidos no FTIR (*Fourier Transform InfraRed Spectroscopy*). A Equação 11 foi obtida no FTIR para o parâmetro substâncias redutoras ( $SR$ ), com 4 padrões.

$$FTIR_{SR} = 0,802 \frac{SR}{g/L} - 23,613; R^2 = 0,924 \quad (\text{Eq.11})$$

O procedimento para a obtenção dos açúcares totais ( $A\acute{C}T$ ) foi ligeiramente diferente. Inicialmente, procedeu-se à diluição de sangria, de acordo com a sua massa volúmica (a correspondência das diluições de acordo com a massa volúmica está presente no método das substâncias redutoras). De seguida, procedeu-se à descloração do defecado com carvão ativado (Figura 16A). Depois, num balão de *Erlenmeyer* de refluxo, adicionaram-se 10 mL da amostra de sangria filtrada e 0,3 mL de HCl a 37 %. Seguidamente, aqueceu-se em banho-maria (a cerca de 100 °C) (Figura 16B) durante 15 min e deixou-se arrefecer naturalmente pelo menos 30 min. Este processo permite a inversão da sacarose por hidrólise ácida. Posteriormente, adicionaram-se 0,3 mL de NaOH (12 mol/L), 15 mL de água

desionizada e 25 mL de solução cupro-alcalina e levou-se à ebulição (feito em aproximadamente 2 min). Adaptou-se o condensador de refluxo ao balão e deixou-se em ebulição durante 10 min (Figura 16C). Depois da ebulição, adicionaram-se 10 mL de solução de iodeto de potássio a 30 %, 25 mL de ácido sulfúrico a 25% e 2 mL de solução de amido. Seguidamente, realizou-se uma titulação com uma solução de tiosulfato de sódio, 0,1 mol/L.

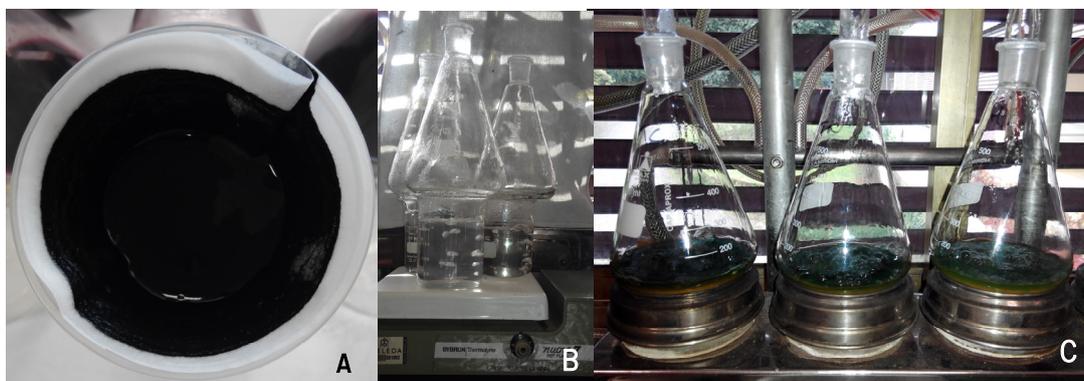


Figura 16 – Procedimento de quantificação de açúcares totais: (A – Filtração da amostra depois de estar em contacto com carvão ativado; B – Colocação da amostra em banho-maria; C – Ebulição das amostras).

Na titulação com uma solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol/L, obteve-se a cor bege acastanhada a violáceo no caso da sangria (Figura 17).



Figura 17 – Coloração da amostra antes da titulação à esquerda e após a titulação à direita.

A diferença entre os volumes inicial  $V_2$  e final  $V_1$  de tiosulfato gasto na titulação ( $\Delta V$ ) permite determinar o valor correspondente de substâncias redutoras ( $SR$ ) presente na Tabela I.2 em Anexo I. Para obter o teor de açúcar total ( $A\mathcal{C}T$ ) recorreu-se a operações apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Métodos de cálculo do teor de Açúcar Total ( $A\mathcal{C}T$ ) (g/L), tendo em conta  $SR$  e diluições efetuadas

Diluições	Correções a aplicar aos valores de $SR$ da Tabela I.2
10 %	$SR * 10$
20 %	$SR * 2,5$
20 mL de amostra não diluída	$SR * 0,5$
Sem diluição	$SR * 0,2$

### 3.2.6 Determinação do teor de Ácido Sórbico

A determinação do teor de ácido sórbico (*AS*) foi baseada no método OIV-MA-AS313-14B:R2009. Este método consistiu na destilação de sangria por arrastamento de vapor e leitura da absorvância do destilado por espectrofotometria ultravioleta, a 256 nm. O equipamento utilizado para a destilação foi o mesmo utilizado no procedimento da acidez volátil. Para a análise espectroscópica usou-se o espectrofotómetro *Jasco V-530*.

No caso da sangria, diluiu-se para metade antes de realizar o procedimento. Ao realizar a leitura da absorvância da amostra de sangria, o valor da concentração foi obtido automaticamente a partir da reta de calibração (Equação 12). O resultado fornecido pelo espectrofotómetro foi multiplicado por 200, em vez de 100, como é referido no método, uma vez que a sangria foi diluída para metade, obtendo-se assim a concentração de ácido sórbico na amostra.

$$Abs_{256\text{ nm}} = 0,0162 \frac{AS}{\text{mg/L}} + 0,2068; R^2 = 0,996 \quad (\text{Eq.12})$$

### 3.2.7 Determinação do Título Alcoométrico Volúmico e da Massa Volúmica

Foi utilizado um aparelho de destilação *Oenochemical electronic destilling unit* (Super D.E.E.) (Figura 18 A) e um densímetro digital de marca *Anton Paar 4100 M* (Figura 18 B) de forma a obter o Título Alcoométrico Volúmico (*TAV*) das sangrias.

Para a destilação, introduziram-se 100 mL de amostra de sangria num balão de destilação, (Figura 18 C). Lavou-se o balão onde estava a sangria 4 vezes com, aproximadamente, 5 mL de água desionizada, de cada vez, e introduziram-se essas porções no balão de destilação. Posteriormente, adicionaram-se ao balão de destilação, uma suspensão de hidróxido de cálcio (4 mol/L), até a sangria obter uma cor esverdeada, e uma solução aquosa de silicone (q.b.) a 10 mL/L, para evitar a formação de espuma. Seguidamente, colocou-se o balão volumétrico onde estava a sangria com um pouco de água desionizada no local de recolha do destilado e iniciou-se a ebulição. Recolheu-se um volume de destilado correspondente a aproximadamente 75 % a 80 % do volume inicial; Perfez-se o volume com água desionizada e colocou-se no banho termostático a 20 °C. Depois colocou-se parte do destilado no densímetro digital e obteve-se *TAV*.



Figura 18 – Procedimento de determinação do título alcoométrico volúmico (A - Equipamento de destilação automático; B - Ebulição da sangria com leite de cal e silicone anti-espuma; C - Amostras de sangria no banho 20 °C; D - Densímetro digital).

É importante referir, que este procedimento foi utilizado, periodicamente, para proceder à verificação de valores obtidos no FTIR. A Equação 13 foi a obtida no FTIR para o parâmetro  $TAV$  com 7 padrões:

$$FTIR_{TAV} = 0,687 \frac{TAV}{\%} - 0,165; R^2 = 0,993 \quad (\text{Eq.13})$$

O densímetro digital *Anton Paar 4100 M* também foi utilizado para determinar diretamente a massa volúmica a 20 °C ( $\rho_{20\text{ °C}}$ ) das sangrias. Antes desta medição, as sangrias estiveram em banho termostatzado a 20 °C.

### 3.2.8 Determinação do Extrato Seco Total

O extrato seco total ( $EST$ ) foi determinado recorrendo ao método OIV-MA-AS2-03B:R2012, sendo calculado, indiretamente, a partir da densidade do vinho desalcoolizado.

### 3.2.9 Doseamento dos Compostos Voláteis

O doseamento dos compostos voláteis da sangria envolveu a sua extração líquido-líquido com diclorometano e, posterior separação e quantificação por GC-MS. Este procedimento foi realizado no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

#### 3.2.9.1 Extração líquido-líquido

A extração dos compostos voláteis foi feita com base no método descrito por Oliveira *et al.* (2006).

Em tubos de cultura de 10 mL (Pyrex, ref. 1636/26MP) adicionaram-se 8 mL de sangria descongelada, em água fria, 100 µL de solução de padrão interno (4-nonanol a 35,4 mg/L em etanol absoluto), e uma barra de agitação magnética (22,2 mm × 4,8 mm).

A extração foi realizada por mistura da amostra com 400 µL de diclorometano durante 15 min, numa placa de agitação magnética. Após o arrefecimento a 0 °C durante 10 min, a barra de agitação magnética foi removida e fechou-se o tubo. A fase orgânica foi separada por centrifugação a 4 °C durante 5 min ( $FCA$ ) = 5118. Em seguida, arrefeceu-se novamente o tubo a 0 °C durante 5 min. O extrato aromático foi recolhido para um vial utilizando uma pipeta de Pasteur, adicionou-se sulfato de sódio anidro em excesso para desidratar e transferiu-se para um novo vial. Para cada sangria foram realizadas extrações em triplicado (3 garrafas diferentes) e analisadas por GC-MS.

#### 3.2.9.2 Quantificação por GC-MS

A análise dos compostos voláteis dos extratos aromáticos foi realizada de acordo com Genisheva *et al.* (2014). O equipamento utilizado foi um GC-MS *Varian Saturn 2000* equipado com injetor *1079* e um detetor de massas *ion-trap* (IT-MS), e uma coluna *Sapiens-Wax MS Teknokroma* (30 m × 0,15 mm; espessura de filme de 0,15 µm). O gás de transporte usado foi hélio GHE4× (Praxair) a um caudal constante de 1,3 mL/min. Para cada extrato foi feita a injeção de 1 µL de amostra em modo *splitless* (durante 30 s; razão de *split* de 30 mL/min). As condições do IT-MS foram em modo impacto eletrónico, 70 eV, com uma gama de aquisição de 35  $m/z$  a 300  $m/z$  ( $delay$  = 2,18 min). A temperatura do injetor e da linha de transferência foram de 250 °C. A temperatura da coluna foi inicialmente estabelecida a 60 °C durante 2 min e em seguida, aumentada de 60 °C a 234 °C, a uma taxa de 3 °C/min, aumentada de 234 °C a 260 °C, a uma taxa de 5 °C /min e, finalmente mantida a 260 °C durante 5 min. A análise de cada amostra durou 70,20 min.

A identificação e análise semiquantitativa, como equivalentes de 4-nonanol, dos compostos foi realizada através do software *Star – Chromatography Workstation* versão 6.9.3 (Varian), comparando

os seus espetros de massa e índices de retenção com os de substâncias de referência puras. Os compostos voláteis que foram selecionados para quantificar estão presentes na Tabela 12.

Tabela 12 – Grupo de compostos voláteis que foram quantificados por GC–MS

Ésteres	Compostos
Ésteres etílicos de ácidos gordos	Butirato de etilo
	Hexanoato de etilo
	Octanoato de etilo
	Decanoato de etilo
Acetatos álcoois superiores	Acetato de 3-metil-1-butilo
	Acetato de 2-feniletilo
Ésteres etílicos ácidos fixos	Lactato de etilo
	Sucinato de dietilo
Ácidos gordos voláteis	Ácido 2-metilbutírico+3-metilbutírico
	Ácido hexanóico
	Ácido octanóico
Terpenos	Linalol
	$\alpha$ -terpineol
Fenóis voláteis	4-etilguaicol
	4-etilfenol
Aldeídos	Furfural
	5-hidroximetilfurfural
Outros	<i>trans, trans</i> -2,4-hexadien-1ol

Os ésteres etílicos de ácidos gordos e os acetatos de álcoois superiores foram quantificados, porque fornecem carácter frutado às sangrias. Estes compostos tendem a decrescer ao longo de tempo, e estão, normalmente acima do limiar de perceção olfativo (*LPO*) e, como tal, houve interesse em quantificá-los. Quanto aos ácidos gordos voláteis, estes foram selecionados por serem representativos de bebidas à base de vinho e de estarem presentes, normalmente, acima de *LPO*. Os ésteres etílicos de ácidos fixos foram quantificados, porque aumentam com a idade do produto. Os terpenos foram avaliados, porque tendem a decrescer e podem advir do aroma que é adicionado à sangria Casal Garcia. Relativamente aos aldeídos, que resultam da degradação do açúcar, houve interesse em estimá-los porque a sangria possui muito açúcar e no envelhecimento esteve sujeita ao fator temperatura que acelera a produção destes compostos. Por último, houve interesse em avaliar a possível presença do composto *trans, trans*-2,4-hexadien-1ol, precursor do 2-etoxi-3,5-hexadieno, responsável pelo odor indesejável a gerânio.

### 3.2.10 Medição da Cor

#### 3.2.10.1 Espectrofotometria

A cor foi lida por espectrofotometria utilizando uma cuvete de 1 cm de passo óptico e água destilada como branco. A absorção foi medida nos comprimentos de onda 420 nm ( $Abs_{420}$ ), 520 nm

( $Abs_{520}$ ) e 620 nm ( $Abs_{620}$ ) para avaliar a intensidade de cor, a tonalidade de cor e a estrutura cromática de sangrias (método de *Glories*).

A intensidade de cor ( $IC$ ) foi calculada a partir da Equação 14:

$$IC = Abs_{420} + Abs_{520} + Abs_{620} \quad (\text{Eq.14})$$

A tonalidade de cor ( $TC$ ) foi obtida a partir da Equação 15:

$$TC = Abs_{420}/Abs_{520} \quad (\text{Eq.15})$$

A estrutura cromática da sangria foi calculada tendo em conta a razão entre as absorvâncias ( $Abs_{420}$ ), ( $Abs_{520}$ ), ( $Abs_{620}$ ) e a intensidade da cor ( $IC$ ), obtendo a % de pigmentos amarelos (Equação 16) a % de pigmentos vermelhos (Equação 17) e a % de pigmentos azuis (Equação 18), respetivamente.

$$\text{Pigmentos Amarelos} = \frac{Abs_{420}}{IC} * 100 \% \quad (\text{Eq.16})$$

$$\text{Pigmentos Vermelhos} = \frac{Abs_{520}}{IC} * 100 \% \quad (\text{Eq.17})$$

$$\text{Pigmentos Azuis} = \frac{Abs_{620}}{IC} * 100 \% \quad (\text{Eq.18})$$

### 3.2.10.2 Coordenadas CIELab

Para a avaliação da coordenadas CIELab procedeu-se à medição da absorvância num espectrofotómetro *Jasco UV/Vis V-560*, numa gama de comprimentos de onda entre 380 nm e 770 nm, com frequência de leitura de 2 nm. Leu-se a absorvância das amostras numa cuvete de quartzo de 1 mm de passo ótico, utilizando como referência uma cuvete de quartzo com água destilada.

Os parâmetros definidos no equipamento foram os seguintes: *photometric mode* ( $Abs$ ), *response* (*medium*), *band width* (5,0 nm), *Scanning speed* (1000 nm/min), *start* (770 nm), *End* (380 nm); *Data Pitch* (2,0 nm). Seguidamente, colocou-se uma cuvete vazia na célula de referência, permanecendo sempre no local durante todas as medições. Realizou-se o auto-zero (sem cuvete no local de amostra) e mediu-se a amostra de sangria, colocando a cuvete no local respetivo. O auto-zero foi sempre realizado entre as medições de amostra. Depois de obter os dados da absorvância procedeu-se à aplicação de um algoritmo elaborado para o software *Matlab*, para obtenção das coordenadas CIELab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ).

A partir dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  procedeu-se ao cálculo das coordenadas cromáticas  $C^*$  (saturação) e  $H^*$  (tonalidade).

A saturação ( $C^*$ ) foi calculada pela Equação 19:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Eq.19})$$

A tonalidade ( $H^*$ ) foi calculada pela Equação 20:

$$H^* = \arctg(b^*/a^*) \quad (\text{Eq.20})$$

Foi ainda calculada a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) pela (Equação 21), tendo em conta as coordenadas,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , entre o tempo 0 d e 31 d; 31 d e 62 d; 62 d e 93 d; 93 d e 124 d e 0 d e 124 d.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Eq.21})$$

As cores representativas das sangrias foram obtidas a partir das coordenadas  $L^* a^* b^*$  e utilizando um algoritmo desenvolvido para o software *Mathematica version 10* (demo), Wolfram Research Inc., Champaign IL (2016).

### 3.2.11 Determinação do Tempo de Prateleira da sangria Casal Garcia

O tempo de prateleira foi calculado para as sangrias Casal Garcia tratadas com sorbato de potássio do ensaio de envelhecimento, às temperaturas de 30 °C e 40 °C. Para o cálculo foi tido em conta, a evolução da coordenada  $b^*$  (azul/amarelo), até atingir valores positivos e foram utilizadas as equações 7, 8 e 9 presentes no subcapítulo 2.2.2.2. As equações 7 e 8 foram utilizadas para calcular  $Q_{10}$  e o fator de aceleração ( $FA$ ), que advêm da equação de Arrhenius e a equação 9 foi utilizada para extrapolar o tempo de prateleira ( $t_i$ ) para 20 °C, tendo em conta esse tempo à temperatura de aceleração  $t_a$  (40 °C).

### 3.2.12 Determinação da Turbidez

Na determinação da turbidez, primeiramente, procedeu-se à calibração do Turbidímetro da marca *Hach 2100N*, conforme indicado pelo fabricante. Posteriormente, colocaram-se as amostras de sangria num frasco de vidro específico do equipamento bem limpo por fora, para que não houvesse interferências na leitura da turbidez, como Unidades de Turvação Nefelométrica, *NTU* (*nephelometric turbidity units*).

### 3.3 Análises Microbiológicas

Tendo por base o esquema da Figura 9, foram realizadas análises microbiológicas a diversas amostras de sangria para diferentes indicadores microbiológicos.

Começou-se por colocar 10 mL de amostra de sangria num tubo estéril e centrifugou-se a  $4000 \text{ rpm}^{-1}$  durante 10 min para recuperar as células microbianas. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de solução de água peptonada. A partir daí pipetou-se 1 mL para uma placa de Petri com meio de cultura, de acordo o microrganismo em estudo (descrição nos subcapítulos 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4). Este procedimento foi baseado em Portugal *et al.* (2014) e foi realizado apenas 15 d e 31 d após o envelhecimento das sangrias com diferentes conservantes, devido ao facto da carga microbiana ser baixa no início. Posteriormente, não se utilizou centrifugação e recorreu-se a diluições decimais sucessivas.

Todos os meios de cultura e a água peptonada foram esterilizados em autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 15 min.

Os indicadores de interesse nas análises foram os microrganismos totais, as leveduras em geral, as leveduras do género *Brettanomyces*, as bactérias acéticas e as bactérias lácticas.

#### 3.3.1 Microrganismos Totais

Para efetuar a contagem de microrganismos totais por incorporação, utilizou-se o meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA) da marca Frilabo e incubaram-se as placas em estufa a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 3 d. Além de diluições sucessivas também foi utilizado o método por filtração esterilizante com membranas de acetato de celulose e nylon com porosidade de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  e  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ .

#### 3.3.2 Leveduras

A contagem de leveduras foi realizada através da incorporação da amostra de sangria no meio *WL Nutrient Agar* após 48 h a 72 h de incubação em estufa a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Além do método de incorporação, foi realizada filtração esterilizante com membranas de acetato de celulose e nylon com porosidade de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ .

Para realizar a pesquisa de leveduras do género *Brettanomyces* adicionaram-se 20 mL de sangria a um meio de cultura líquido *Brett Allert* e deixou-se a incubar em estufa durante 9 d a 12 d, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se no

final desse período existisse o odor característico a fenol, o resultado era positivo (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Rodrigues *et al.*, 2001).

### 3.3.3 Bactérias Acéticas

Foi ainda elaborada a contagem de bactérias acéticas por incorporação em meio de cultura *Acetobacter Agar* (glucose) da marca Himedia e no meio de cultura *Glucose Yeast Agar (GYC)*, quando o anterior meio terminara. Este meio de cultura foi produzido em laboratório com os ingredientes: glucose (50 g/L) da Panreac, extrato de levedura (10 g/L) da Microkit, carbonato de cálcio (5 g/L) da Sigma-Aldrich e agar (20 g/L) da Microkit. As colónias de bactérias acéticas nestes meios apresentam pigmentos acastanhados solúveis em água. A produção do ácido acético é demonstrada pela dissolução do carbonato de cálcio (o meio de cultura originalmente opaco torna-se translúcido) (Pardo *et al.*, 2015). O período de incubação das placas em estufa foi de 2 d a 4 d, a 28 °C.

### 3.3.4 Bactérias Lácticas

Para realizar a contagem de bactérias lácticas (por incorporação) usou-se o meio de cultura MRS (*Man Rogosa and Sharp*) agar da marca Frilabo, sob condições anaeróbicas, com o auxílio de uma jarra de anaerobiose. As placas foram depois incubadas a 28 °C durante 3 d. Além do método de incorporação, foi realizada filtração esterilizante com membranas de acetato de celulose e nylon com porosidade de 0,22 µm.

### 3.3.5 Conversão da contagem de colónias para UFC

Para a leitura dos resultados consideraram-se as placas com um máximo de 300 colónias em duas diluições consecutivas. Calculou-se o número de unidades formadoras de colónias (UFC), tendo em conta a Equação 22 (Adams e Moss, 2008).

$$\frac{UFC}{mL^{-1}} = \frac{\sum Col}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \quad (\text{Eq.22})$$

$\sum Col$  – Soma das colónias contadas em duas placas consideradas;

$n_1$  – número de placas consideradas na primeira diluição;

$n_2$  – número de placas consideradas na segunda diluição;

$d$  – factor de diluição correspondente à primeira diluição considerada.

Se a placa correspondente à amostra (produtos líquidos) ou à suspensão-mãe não contivesse qualquer colónia, apresenta-se o resultado sobre a forma:  $UFC < 1 \text{ mL}^{-1}$ ;

Se a placa correspondente à amostra (produtos líquidos) ou à suspensão-mãe obtivesse mais do que 300 colónias, isto é, em qualquer diluição efetuada os valores fossem incontáveis, o resultado é apresentado da seguinte forma:  $UFC > 3,00 \times 10^2 \text{ mL}^{-1}$ .

### 3.3.6 Coloração de gram

Para diferenciar as bactérias lácticas das acéticas, além de usar meios seletivos, utilizou-se a coloração de gram, pois as bactérias lácticas são gram-positivo e as bactérias acéticas são gram-negativo (Pardo *et al.*, 2015).

Antes de proceder à técnica de coloração de gram, realizou-se a técnica do esfregaço que consistiu em colocar, com uma pipeta/ansa, uma colónia numa lâmina e fez-se passar à chama de bico de Bunsen 3 vezes, a uma altura que permitisse estar com mão sem queimar e, por fim, deixou-se arrefecer. A técnica de coloração de gram está descrita no esquema abaixo.

Colocou-se algumas gotas de cristal violeta no esfregaço e deixou-se atuar durante 1 min.



Colocou-se algumas gotas de solução de iodo, lugol e deixou-se atuar durante 1 min.



Eliminou-se o excesso de reagente



Descorou-se com álcool a 96 % durante alguns segundos



Passou-se por água e secou-se com papel absorvente



Cobriu-se com corante de contraste, safranina



Passou-se por água e secou-se com papel absorvente



Visualizou-se ao microscópio com a objetiva de ampliação de 100 ×, colocando previamente uma gota de óleo de imersão

### 3.3.7 Pesquisa da catalase

Para realizar a pesquisa da catalase colocou-se sobre uma lâmina de vidro uma gota de água oxigenada a 3 % e espalhou-se uma porção da cultura a avaliar com uma ansa de repicagem. Depois, verificou-se se houve ou não despreendimento gasoso ( $O_2$ ), através da presença de bolhas (caso positivo) e ausência de bolhas (caso negativo) (Pardo *et al.*, 2015).

## 3.4 Análises Sensoriais

Todas as provas sensoriais realizadas neste trabalho de dissertação foram efetuadas na sala de provas da Aveleda (Figura 19) durante todo o dia, conforme a disponibilidade de provadores/colaboradores de diferentes departamentos da Aveleda e da parte da manhã, num outro dia, num laboratório do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.



Figura 19 – Sala de Provas da Aveleda.

### 3.4.1 Prova Descritiva

A prova descritiva de sangrias foi baseada no método descrito por DeMarchi *et al.* (2003). Esta foi realizada por um painel heterogéneo de 24 provadores, alguns com experiência e outros principiantes. Todas as sangrias foram colocadas em garrafas de vidro transparentes com um código de 3 dígitos aleatórios e em frente aos copos foi colocada uma folha com os dígitos correspondentes a cada amostra. As sangrias foram servidas em copos de degustação certificados, segundo a norma ISO 3591.

A avaliação da qualidade das sangrias foi realizada segundo uma escala discreta de 9 pontos de acordo com a norma ISO 4121:2003. As opções da escala eram ausente (1), extremamente fraco (2), muito fraco (3), fraco (4), moderado (5), ligeiramente forte (6), forte (7), muito forte (8) e extremamente forte (9). Foram avaliados em prova diversos descritores da cor, do aroma e do sabor. Na componente aromática foi ainda solicitado aos provadores para selecionarem aromas e *off-flavours*

que conseguissem detetar em específico. A folha de prova encontra-se em anexo II. Além da pontuação na escala de 1 a 9 foi solicitado ainda, aos provadores, a apreciação global ( $A_{global}$ ) das sangrias numa escala de 0 a 20. As pontuações finais foram calculadas como a média ( $A_m$ ), tendo em conta a avaliação de cada provador.

### 3.4.2 Teste de Preferência

Foi realizado um teste de preferência por ordenação, com base na norma ISO 8587:2006. No teste de preferência das 5 formulações de sangria participaram 40 provadores, alguns com experiência, alguns principiantes e outros possíveis consumidores. Em relação ao teste de preferência de lotes de sangria, estiveram presentes os mesmos provadores da prova descritiva (24 provadores). As sangrias foram codificadas com três dígitos aleatórios. Na Figura 20 está presente a ficha de prova do teste de preferência.

Indique a amostra por ordem de preferência (da menos preferida à mais preferida):

	(-) Intensidade crescente de preferência      —→ (+)			
Código				

Figura 20 – Ficha de prova do teste de preferência por ordenação.

### 3.4.3 Teste de Aceitação e de Intenção de Compra

No teste de aceitação cooperaram 71 provadores, entre os quais colaboradores da Aveleda, SA, investigadores do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho e ainda eventuais consumidores da empresa Ecobite e do restaurante Casa do Campo, que se disponibilizaram para o efeito. Os testes de aceitação e de intenção de compra consistiram numa escala hedónica de 9 e 5 pontos, respetivamente. A escala encontrava-se descrita, tendo sido apenas necessário a colocação de uma cruz por parte dos provadores. Neste teste, apenas foi apenas referido que se tratava de uma sangria, não tendo sido exposto, qualquer outro tipo de informação. Na ficha de prova foi solicitado ao provador o seu sexo e a sua faixa etária. Foi ainda requerido aos provadores que referissem por escrito o que gostaram mais e menos na amostra de sangria. Em anexo III está presente a folha de prova de aceitação.

### 3.4.4 Teste de Detecção de Diferenças

Os testes de deteção de diferenças, em concreto os testes triangulares, foram elaborados de acordo com a norma ISO 4120:2004. Essa norma também foi tida em conta na verificação de respostas certas (Tabela A.1 presente na norma). O nível de significância usado foi de 5 %. As amostras de sangria foram codificados com 3 dígitos aleatórios.

No teste triangular da deteção de gengibre e no teste com as sangrias com glicosídeos de steviol e com MCR estiveram 40 provadores, alguns experientes, outros principiantes e alguns consumidores.

No caso do teste triangular com sangria pasteurizada e não pasteurizada cooperaram 37 provadores, alguns experientes, outros principiantes e alguns consumidores.

### 3.5 Análise Estatística

Nesta dissertação foram utilizados diversos testes estatísticos que melhor se adaptaram ao tratamento dos resultados obtidos. Para o efeito foi utilizado o software estatístico SPSS versão 23.0 (*IBM SPSS statistics*). Em todas as análises considerou-se um nível de significância de 5 % ( $p \leq 0,05$ ). Os erros associados à média de três leituras das análises deste trabalho de dissertação foram calculados pela distribuição de *t* de *Student*, para um grau de confiança de 95 %.

Na Tabela 13 estão presentes os testes estatísticos utilizados para cada tipo de análise realizada nas quatro etapas deste trabalho.

Tabela 13 – Testes estatísticos utilizados na análise dos resultados das quatro etapas deste trabalho

Amostras/Procedimento	Tipos de Análises	Teste Estatístico
Caraterização de Sangrias comerciais	Análises físico-químicas	Análise de Variância (Anova), teste de comparação de médias, Teste de Tukey
Ensaio de Envelhecimento da Sangria Casal Garcia	Análises físico-químicas	Análise de Variância (Anova) de medidas repetidas
Controlo de Qualidade de Lotes de Sangria Casal Garcia	Análise físico-químicas	Análise de Variância (Anova), teste de comparação de médias, Teste de Tukey Análise de Variância Anova de medidas repetidas para a $C_{SO2 \text{ livre}}$
	Análise Sensorial Apreciação Global	Análise de Variância (Anova), teste de comparação de médias, Teste de Tukey
	Análise Sensorial Aromas em específico Análise Sensorial Teste de Preferência	Análise em Componentes Principais Categórica (CATPCA) Teste não paramétrico de Friedman
Novas Formulações de Sangria	Teste de preferência de 5 formulações	Teste não paramétrico de Friedman
	Testes de deteção de diferenças	ISO 4120:2004
Sangria Pasteurizada e não pasteurizada	Análises físico-químicas	Análise de Variância (Anova), teste de comparação de médias, Teste de Tukey

A análise em Componentes Principais categórica (CATPCA) aos aromas selecionados pelos provadores, na análise sensorial dos 4 lotes de sangria foi realizada de forma a reduzir a dimensão dos dados e poder assim melhor interpretar os resultados obtidos. A CATPCA apresenta os resultados por dimensões e para cada dimensão refere um coeficiente de consistência interna (*Alpha* de *Cronbach*), um valor próprio e uma variância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo, em consonância com o de Materiais e Métodos é dividido em quatro partes. A primeira parte é constituída pelos resultados da caracterização físico-química da sangria Casal Garcia, de sangrias comercializadas em Portugal e nos EUA e de uma sangria que foi desenvolvida na empresa no âmbito deste trabalho. Na segunda parte são apresentadas todas as análises físico-químicas e microbiológicas de sangrias Casal Garcia do ensaio de envelhecimento acelerado. A terceira parte refere-se ao controlo de qualidade físico-químico, microbiológico e sensorial de quatro lotes de sangria Casal Garcia engarrafada. Por último, são apresentados os dados, depois de tratados, de análises sensoriais de novas formulações de sangria.

Salvo indicação em contrário, os resultados correspondem a médias de três diferentes garrafas, e os erros associados foram calculados pela distribuição de *t-Student*, para um grau de confiança de 95 %.

### 4.1 Caraterização de Sangrias Comerciais

#### 4.1.1 Parâmetros físico-químicos

Para efeitos de comparação com a sangria produzida Casal Garcia, foram efetuadas análises físico-químicas a este produto e a um outro, desenvolvido na empresa, no âmbito deste trabalho, e ainda a sangrias comercializadas em Portugal (Marca 1 a 5) e nos EUA (Marca 6 a 9). Foram avaliados alguns parâmetros de qualidade, nomeadamente acidez volátil (*AV*) e total (*AT*), pH, dióxido de enxofre livre ( $C_{SO_2 \text{ livre}}$ ) e total ( $C_{SO_2 \text{ total}}$ ), extrato seco total (*EST*), título alcoométrico volúmico adquirido (*TAI*), turbidez, açúcares totais (*ACT*) e massa volúmica ( $\rho_{20\text{ }^\circ\text{C}}$ ). Além disso, quantificou-se o ácido sórbico de forma a verificar a sua possível utilização em sangrias comerciais. É de salientar que as sangrias comerciais não possuem a mesma idade e, como tal, o interesse destas análises deveu-se apenas ao interesse em fazer a caracterização deste tipo de produtos para comparar a gama de valores obtidos nos parâmetros avaliados. Além disso, serviram para as situar face ao produto desenvolvido pela Aveleda e à nova formulação desenvolvida no âmbito deste trabalho.

Em relação à formulação de Sangria produzida em laboratório, a ideia foi introduzir novos ingredientes permitidos no Regulamento (UE) n.º 251/2014, cuja formulação se encontra na Tabela 8.

Os resultados foram sujeitos a uma análise de variância ANOVA, sendo analisados pela comparação de médias a partir do teste de Tukey HSD. Os resultados dos parâmetros físico-químicos avaliados às sangrias comercializadas em Portugal e nos EUA e da desenvolvida no âmbito deste trabalho encontram-se apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados das análises físico-químicas efetuadas a sangrias comercializadas em Portugal (Marca 1 a 5) e nos EUA (Marca 6 a 9) e da desenvolvida no âmbito deste trabalho. Para cada parâmetro é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado com 95 % de confiança

Sangrias	$C_{SO_2 \text{ livre}}$		$C_{SO_2 \text{ total}}$		$AS$		$AV$		$AT$		pH	$NTU$	$A_{\text{çT}}$		$\rho_{20^\circ\text{C}}$		$TAV$		$EST$				
	mg/L	±	mg/L	±	mg/L	±	g/L	±	g/L	±			±	±	g/L	±	g/cm <sup>3</sup>	±	%	±	g/dm <sup>3</sup>	±	
Portugal	Marca 1	41,33 <sup>c</sup>	1,43	114,00 <sup>d,e</sup>	31,01	144,67 <sup>d</sup>	10,34	0,42 <sup>a</sup>	0,34	4,40 <sup>a</sup>	0,13	3,34 <sup>c,d</sup>	0,15	0,39 <sup>a</sup>	3,26	87,39 <sup>d,e</sup>	1,07	1,028 <sup>d,e</sup>	0	8,18 <sup>d</sup>	0,33	106,45 <sup>e,f</sup>	10,34
	Marca 2	31,00 <sup>c</sup>	4,30	85,00 <sup>c</sup>	2,48	nd <sup>a</sup>	-	0,32 <sup>a</sup>	0,19	5,12 <sup>b,c</sup>	0,43	3,00 <sup>a</sup>	0,26	0,38 <sup>a</sup>	19,23	68,19 <sup>c,d</sup>	19,23	1,029 <sup>e,f</sup>	0	6,77 <sup>a</sup>	0,21	105,25 <sup>e</sup>	0
	Marca 3	9,33 <sup>a,b</sup>	9,40	138,70 <sup>f</sup>	1,43	70,67 <sup>b</sup>	2,87	0,88 <sup>b</sup>	0,52	5,15 <sup>b,c</sup>	0,25	3,10 <sup>a,b</sup>	0,27	1,30 <sup>a</sup>	5,45	54,15 <sup>b,c</sup>	5,45	1,023 <sup>c</sup>	0	7,27 <sup>b,c</sup>	0,15	89,60 <sup>b,c</sup>	2,87
	Marca 4	10,67 <sup>a,b</sup>	5,17	33,30 <sup>a</sup>	7,17	128,00 <sup>c</sup>	4,97	0,49 <sup>a</sup>	0,45	4,50 <sup>a,b</sup>	0,34	3,15 <sup>a,b,c</sup>	0,18	1,01 <sup>a</sup>	4,96	20,14 <sup>a</sup>	4,96	1,004 <sup>a</sup>	0	7,07 <sup>a,b</sup>	0,17	40,78 <sup>a</sup>	4,97
	Marca 5	6,00 <sup>a,b</sup>	4,30	57,30 <sup>b</sup>	3,79	nd <sup>a</sup>	-	0,45 <sup>a</sup>	0,12	5,47 <sup>c,d</sup>	0,50	3,10 <sup>a,b</sup>	0,18	1,19 <sup>a</sup>	6,18	44,01 <sup>b</sup>	6,18	1,027 <sup>d</sup>	0	6,98 <sup>a,b</sup>	0,87	99,13 <sup>d</sup>	0
Desenvolvida	15,33 <sup>b</sup>	27,4	91,00 <sup>c,d</sup>	53,42	174,00 <sup>e</sup>	4,97	0,52 <sup>a</sup>	0,11	6,06 <sup>d</sup>	1,02	3,16 <sup>a,b,c,d</sup>	0,03	1,39 <sup>a</sup>	12,22	56,35 <sup>b,c</sup>	12,22	1,020 <sup>b</sup>	0	9,60 <sup>e</sup>	0,52	90,42 <sup>b,c</sup>	4,97	
EUA	Marca 6	10,00 <sup>a,b</sup>	4,30	90,70 <sup>c,d</sup>	10,34	147,67 <sup>d</sup>	6,25	0,43 <sup>a</sup>	0,04	5,95 <sup>d</sup>	0,07	3,15 <sup>a,b,c</sup>	0,22	1,03 <sup>a</sup>	3,49	54,83 <sup>b,c</sup>	3,49	1,018 <sup>b</sup>	0	9,74 <sup>e</sup>	0,05	86,44 <sup>b</sup>	6,25
	Marca 7	11,00 <sup>a,b</sup>	0,00	132,30 <sup>e,f</sup>	5,17	nd <sup>a</sup>	-	0,54 <sup>a</sup>	0,04	4,24 <sup>a</sup>	0,87	3,20 <sup>a,b,c,d</sup>	0,22	0,72 <sup>a</sup>	23,67	80,01 <sup>d,e</sup>	23,67	1,031 <sup>f</sup>	0	6,93 <sup>a,b</sup>	0,11	109,99 <sup>f</sup>	0
	Marca 8	10,67 <sup>a,b</sup>	5,17	140,00 <sup>f</sup>	13,14	212,67 <sup>f</sup>	2,87	0,61 <sup>a,b</sup>	0,35	5,16 <sup>b,c</sup>	0,11	3,24 <sup>b,c,d</sup>	0,12	1,25 <sup>a</sup>	3,06	67,16 <sup>c,d</sup>	3,06	1,024 <sup>c</sup>	0	7,25 <sup>b,c</sup>	0,21	94,07 <sup>c</sup>	2,87
	Marca 9	2,00 <sup>a</sup>	6,57	71,00 <sup>b,c</sup>	4,30	nd <sup>a</sup>	-	0,39 <sup>a</sup>	0,02	8,76 <sup>e</sup>	0,85	3,38 <sup>d</sup>	0,15	1330,67 <sup>b</sup>	45,25	92,56 <sup>e</sup>	45,25	1,042 <sup>g</sup>	0	7,65 <sup>c</sup>	0,45	140,34 <sup>g</sup>	0

nd – não detetado.

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Para os todos os parâmetros avaliados, tanto em sangrias comercializadas em Portugal como nos EUA, verificaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), o que já era expectável, uma vez que o tempo de armazenamento não é o mesmo.

Os valores de  $\text{SO}_2$  livre e total foram obtidos pelo método de Ripper utilizando o titulador automático.

Em relação ao dióxido de enxofre livre, apenas a Marca 1 e 2 mostraram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação às outras sangrias comercializadas em Portugal e à desenvolvida. Os valores mais baixos nas outras marcas, entre 2,00 mg/L e 15,33 mg/L, podem ser explicados pelo facto de ter ocorrido combinação do dióxido de enxofre, pois este composto liga-se reversivelmente ou irreversivelmente a diversos constituintes do vinho. Os mais comuns são hidroxissulfonatos, que se ligam, principalmente, com compostos de carbonilo, nomeadamente com acetaldeído. Os produtos de ligação de hidroxissulfonatos incluem também o ácido pirúvico, o ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, açúcares, taninos e antocianinas (Jackson, 2008). Também pode ter ocorrido a evaporação  $\text{SO}_2$  no momento da sua análise. No caso das sangrias comercializadas nos EUA, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a Marca 9 e os restantes produtos, sendo esta a que possuía o mais baixo valor de  $\text{SO}_2$  livre (2 mg/L). Os níveis de  $\text{SO}_2$  livre geralmente recomendados para vinho antes do engarrafamento, situam-se na gama de 15 mg/L a 40 mg/L, dependendo da quantidade necessária para se obter cerca de 0,8 mg/L de  $\text{SO}_2$  molecular. A concentração em vinhos tintos é geralmente menor (Jackson, 2008). No caso dos vinhos doces são necessários cerca de 50 mg/L de  $\text{SO}_2$  livre em condições de armazenamento adequadas, para garantir a estabilidade de produtos com *TAV* relativamente baixo (11 %), e de 30 mg/L para os que têm *TAV* mais elevado (13 %) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). No caso da sangria, que se assemelha ao vinho doce, deve possuir maior quantidade de  $\text{SO}_2$  livre, devido ao facto de a maioria dos produtos possuírem um *TAV* mais baixo, entre 7 % e 8 %. No entanto, na maior parte das sangrias é adicionado outro conservante, que auxilia na prevenção de refermentação, o ácido sórbico e/ou um dos seus sais.

No caso do  $\text{SO}_2$  total, que resulta da soma do livre com o combinado, a Marca 4 é a que possui o valor mais baixo (33,3 mg/L) e a Marca 8 é a que possui valor mais alto (140,0 mg/L). Em termos de estabilidade microbiana, no caso de bactérias lácticas, a sensibilidade ao  $\text{SO}_2$  varia. Geralmente, a concentrações de  $\text{SO}_2$  combinado entre 50 mg/L e 100 mg/L e de  $\text{SO}_2$  livre entre 1 mg/L e 10 mg/L, o crescimento de bactérias lácticas pode ser inibido. Henick-Kling (1993) observou uma redução da atividade da fermentação malolática em cerca de 13 % para valores de 20 mg/L de  $\text{SO}_2$  combinado, de 50 % para valores de 50 mg/L e uma inibição total para valores de 100 mg/L. Tendo em conta este facto, só as Marcas 1, 3, 7 e 8 teriam uma concentração de  $\text{SO}_2$  total mais eficaz na inibição do crescimento de bactérias lácticas. No entanto, estas sangrias poderiam ser as mais jovens, não se

podendo estabelecer uma comparação sobre os teores de SO<sub>2</sub> total. De qualquer modo, os valores de SO<sub>2</sub> total respeitam o limite estipulado no Reg. (UE) n.º 606/2009.

Em relação ao teor de ácido sórbico, verificou-se que nas 9 sangrias avaliadas, 5 possuíam este conservante, ou seja, 55,6 % das sangrias. Nos produtos, em que não foi detetado ácido sórbico, nomeadamente, nas Marcas 2, 5, 7 e 9, poderá existir outro conservante indicado no Regulamento (UE) n.º 1129/2011, como o dicarbonato de dimetilo. Todas as marcas que possuem ácido sórbico à exceção da Marca 8, respeitaram o valor estabelecido no Regulamento (UE) n.º 1129/2011 (200 mg/L). Ainda, no que respeita a este parâmetro, as marcas comercializadas em Portugal mostraram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). O mesmo ocorreu para as sangrias comercializadas nos EUA.

O Regulamento (CE) n.º 606/2009 estabelece um limite máximo para a acidez volátil em vinhos tintos, 1,2 g/L. Todas as sangrias avaliadas obtiveram valores abaixo desse limite. A Marca 3 (0,88 g/L) apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), em relação a todas as outras marcas à exceção da Marca 8 (0,61 g/L). Nas restantes não foram notórias diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Os vinhos, que compreendem os 50 % da formulação de sangria, contém uma mistura complexa de ácidos orgânicos nomeadamente tartárico, málico, succínico, acético, cítrico e láctico. O ácido tartárico é o mais forte. Por esta razão, a acidez total de vinho é comumente expressa como ácido tartárico (Torres *et al.*, 2011). Para este parâmetro, as sangrias apresentaram diferenças significativas, tendo sido a Marca 9 a que obteve o valor mais elevado (8,76 g/L). O ácido mais importante encontrado em uvas maduras é o ácido tartárico. Este ácido ocorre em pequenas quantidades nas partes vegetativas de algumas outras plantas, mas raramente nos seus frutos (Jackson, 2008). A sangria da Marca 9 continha polpa de fruta e provavelmente polpa de uva madura.

O pH dos vinhos varia entre 2,80 e 4,00 (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). O pH das sangrias encontra-se no intervalo de 3,00 (Marca 2) a 3,38 (Marca 9). Para produzir sangria acrescenta-se água ao vinho para baixar *TAV*, o que faz aumentar o pH. Para baixar o pH da sangria é adicionado ácido cítrico, pois este, ocasionalmente, pode ser incorporado para acidificar vinhos de pH elevado (Jackson, 2008).

A turbidez foi medida como unidades de turvação nefelométrica (*NTU*), tendo-se verificado que a Marca 1 (0,39) e a Marca 2 (0,38) apresentaram os valores mais baixos. No caso das sangrias comercializadas nos EUA, a Marca 9 possui um valor muito discrepante (1330,67), devendo-se certamente ao facto de possuir polpa de fruta na sua formulação.

No Reg. (UE) n.º 251/2014 não é referido um limite para o teor de açúcares adicionados à sangria, Os açúcares permitidos encontram-se na Tabela 2 no subcapítulo do enquadramento legislativo. Nessa lista não estão presentes adoçantes. Pelos resultados foi possível verificar que a Marca 4 é a menos doce, com 20,14 g/L, e a Marca 9 a mais doce, com 92,56 g/L. Existe, portanto, uma discrepância acentuada, o que leva a concluir que a quantidade de açúcar adicionada não é padronizada. A quantidade de açúcares totais, na maioria das marcas encontra-se numa gama entre 40 g/L e 70 g/L. Relativamente ao título alcoométrico volúmico adquirido (*TAI*), a maioria das Marcas apresentaram valores entre 7 % e 8 %, à exceção da desenvolvida e da Marca 6. Todos os valores estão dentro do intervalo referido no Reg. (UE) n.º 251/2014 (4,5 % a 12 %).

Por fim, no caso do extrato seco, a Marca 1 e a Marca 2, comercializadas em Portugal, foram as que obtiveram valores superiores, com 106,45 g/L e 105,25 g/L, respetivamente. Estas marcas distanciaram-se, significativamente, da Marca 3 (89,6 g/L) e da desenvolvida (90,42 g/L). Nas marcas comercializadas nos EUA verificaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em todas elas, tendo-se destacado a Marca 9 com um valor de extrato seco igual a 140,34 g/L.

#### 4.1.1.1 Cor

Neste subcapítulo são apresentados os resultados da análise da cor às sangrias comerciais. O método utilizado foi o método de *Glories* que consiste na medição da absorvância das amostras de sangria nos comprimentos de onda 420 nm, 520 nm e 620 nm. Os resultados da intensidade de cor (*IC*) e tonalidade de cor (*TC*) encontram-se na Tabela 15. Os dados foram submetidos a uma análise de variância Anova, com um teste de comparação de médias de Tukey HSD.

A nível global ocorreram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na intensidade e na tonalidade de cor das sangrias. Relativamente à intensidade, verificou-se que a Marca 9 foi a que possuiu maior intensidade (2,00), o que pode ser devido ao facto desta sangria possuir polpa de fruta. A seguir situou-se a Marca 1 (0,39). Por outro lado, as sangrias que se aproximam mais são as Marcas 3, 4, 8 e desenvolvida e as Marcas 2, 6 e 7.

A intensidade da cor tem em consideração os compostos que absorvem nos comprimentos de onda correspondentes ao amarelo, ao vermelho e ao azul. Assim, quanto mais elevada for a intensidade de cor de um vinho, maior a quantidade de compostos que absorvem a radiação nestes comprimentos de onda, nomeadamente alguns compostos fenólicos (Rodrigues, 2011).

Tabela 15 – Intensidade de cor (*IC*) e tonalidade de cor (*TC*) de sangrias comercializadas em Portugal e nos EUA e da desenvolvida no laboratório da Avelada, SA. Para cada parâmetro é indicado o valor médio de 3 medições da mesma garrafa e o erro associado com 95 % de confiança

	Sangrias	<i>IC</i>	±	<i>TC</i>	±
Portugal	Marca 1	0,39 <sup>e</sup>	0,00	0,88 <sup>b</sup>	0,00
	Marca 2	0,32 <sup>c, d</sup>	0,01	0,80 <sup>a</sup>	0,01
	Marca 3	0,28 <sup>a, b</sup>	0,02	1,03 <sup>e</sup>	0,00
	Marca 4	0,24 <sup>a, b</sup>	0,01	1,00 <sup>d, e</sup>	0,05
	Marca 5	0,35 <sup>d, e</sup>	0,03	0,95 <sup>c</sup>	0,02
	Desenvolvida	0,24 <sup>a, b</sup>	0,01	0,92 <sup>c</sup>	0,01
EUA	Marca 6	0,30 <sup>c</sup>	0,00	0,99 <sup>d</sup>	0,01
	Marca 7	0,29 <sup>b, c</sup>	0,01	1,25 <sup>h</sup>	0,01
	Marca 8	0,24 <sup>a</sup>	0,01	1,09 <sup>f</sup>	0,06
	Marca 9	2,00 <sup>f</sup>	0,11	1,21 <sup>g</sup>	0,03

letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

As sangrias que possuem menor intensidade de cor, provavelmente, poderão corresponder a vinhos que sofreram maior diluição, aquando do seu processo de produção. O declínio na intensidade de cor pode ser devido à formação de pigmentos poliméricos insolúveis, que precipitam com a fração corante, em vinhos envelhecidos (Alañón *et al.*, 2013).

A tonalidade da cor é um indicador utilizado para avaliar a perda de vermelho dos vinhos. A tonalidade aumenta com o envelhecimento do vinho devido ao processo de copigmentação (inicialmente) e polimerização de antocianinas para formar substâncias mais estáveis que alteram os tons vermelhos, inicialmente azulados, de vinhos jovens, para vermelho alaranjado em vinhos envelhecidos (Marquez *et al.*, 2014; Maroniac e Mihali, 2014). Este parâmetro apresentou valores idênticos para a Marca 5 e para a desenvolvida, com valores 0,95 e 0,92, respetivamente. Nas Marcas 3, 4 e 6 as intensidades também foram idênticas com valores de 0,28; 0,24 e 0,30, respetivamente. As restantes sangrias, isto é, as Marcas 1, 2, 7, 8 e 9 foram significativamente diferentes, sendo que a Marca 7, foi a que apresentou o valor superior, com 1,25. Na literatura é referido que os valores de tonalidade de vinhos jovens variam tipicamente entre 0,5 e 0,7 e acima de 1,3 em vinhos envelhecidos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). As sangrias das Marcas 3, 7, 8 e 9 são as mais envelhecidas, porque têm uma tonalidade superior a 1, ou seja, a absorvância a 420 nm (tons amarelados) é superior à de 520 nm (tons avermelhados). Por outro lado, a sangria mais jovem é a da Marca 2 (0,80) e a seguir vem a Marca 1 (0,88). Na Figura 21 apresentam-se os resultados da distribuição dos pigmentos amarelos, vermelhos e azuis das sangrias comerciais e da desenvolvida.

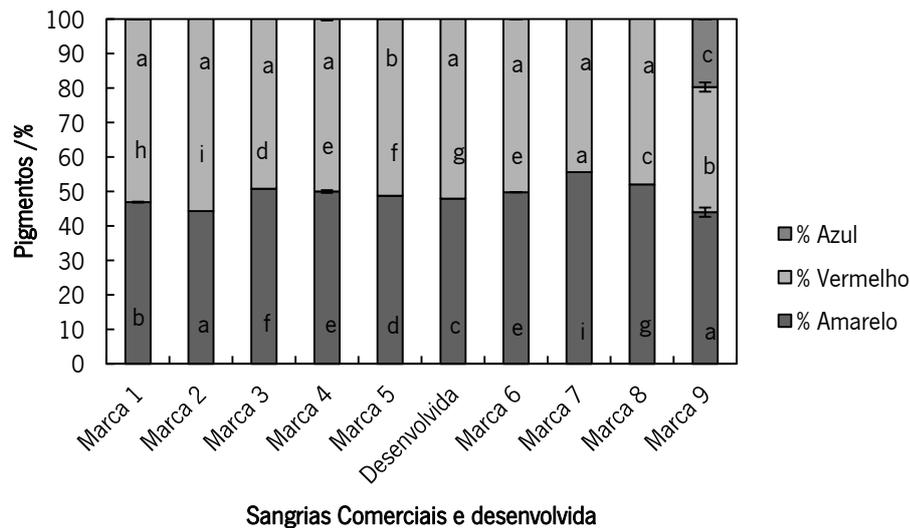


Figura 21 – Estrutura cromática *i.e.*, distribuição dos pigmentos amarelo, vermelho e azul de sangrias comercializadas em Portugal, EUA e desenvolvida.

Quanto aos pigmentos azul, vermelho e amarelo (Figura 21), constataram-se diferenças significativas em todas as sangrias avaliadas. As sangrias mais envelhecidas, isto é, com tonalidade superior a 1 (Marcas 3, 7 e 8) são as que apresentam maior quantidade de pigmentos amarelos, com 50,77 %, 55,58 % e 52,05 %, respetivamente. A Marca 9, apesar de ter uma tonalidade acima de 1, não apresenta grande teor de pigmentos amarelos (43,99 %), isto porque apresenta um valor acentuado de pigmentos azuis (19,71 %), o que se deve provavelmente à presença de polpa de fruta. O valor mais acentuado de pigmentos azuis também pode dever-se a um erro de leitura do espectrofotómetro, a não ser que a sangria da Marca 9 seja jovem. Esta sangria não difere significativamente da Marca 2 em relação aos pigmentos amarelos (44,30 %). À exceção das Marcas 3 e 6, é de notar que as sangrias mais envelhecidas, são as provenientes dos EUA, o que era de esperar, visto haver a probabilidade de possuírem um tempo de armazenamento superior. As sangrias mais jovens referidas acima, nomeadamente as Marcas 1 e 2, são as que têm maior teor de pigmentos vermelhos, com 53,12 % e 55,70 %, respetivamente. A quantidade de pigmentos vermelhos diminui devido, principalmente, à perda de antocianinas livres (Pérez-Magarinõ & González-San José, 2006). Os flavan-3-óis, embora inicialmente sejam incolores, gradualmente tornam-se castanhos devido à oxidação, contribuindo para a componente de pigmentos amarelos. Além disso, o aumento da percentagem do amarelo também é devido à formação de pigmentos amarelo-laranja durante o envelhecimento (Pérez-Magarinõ & González-San José, 2004).

A utilização de um método de *Glories* nas sangrias comerciais foi diferente ao método de leitura da cor de sangrias do ensaio de envelhecimento, devido ao facto do método das coordenadas de cor (CIELab) ainda não ter sido definido.

## 4.2 Ensaios de Envelhecimento Acelerado de Sangria Casal Garcia

### 4.2.1 Parâmetros físico-químicos

Para determinar o tempo de prateleira foram realizados ensaios de envelhecimento da formulação da sangria tinta Casal Garcia, a 30 °C e a 40 °C, de forma a comparar com a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ), a cerca de 20 °C. Estiveram presentes em estudo ainda sangrias, com diferentes conservantes (Sorbato de Potássio – SP e Dicarbonato de dimetilo – DMDC). Neste caso, a sangria controlo consistiu num produto sem a adição de qualquer conservante.

Na Tabela 16 encontram-se os resultados das análises físico-químicas efetuadas ao longo dos 4 meses de envelhecimento (124 d). Neste sentido, foi realizada uma análise de variância, Anova de medidas repetidas, uma vez que as análises foram realizadas, de 31 d em 31 d. As letras indicadas na Tabela 16 indicam diferenças significativas e referem-se apenas ao fator conservante, devido ao facto de não ser possível avaliá-lo, ao mesmo tempo, com os restantes fatores, tempo e temperatura.

Verifica-se que dióxido de enxofre livre tende a diminuir, ao longo do tempo. Dependendo do pH, o  $SO_2$  pode reagir com acetaldeído, glucose, ácido pirúvico e/ou ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, passando à forma combinada (Osborne, 2010). Como a sangria possui açúcar, essa combinação poderá ter ocorrido. Quanto ao dióxido de enxofre livre, apenas uma pequena porção existe sob a forma de gás dissolvido. A pH de 2,9 está 7,5 % disponível e a pH de 3,8 apenas 1 %. Tendo em conta, apenas o fator pH, este parâmetro nas sangrias encontra-se num intervalo que permite a disponibilidade, pois obteve-se valores entre 3,34 e 3,54.

O facto das sangrias possuírem diferentes conservantes, afetou o teor de  $SO_2$  livre, sendo que, a sangria de controlo foi a que possuiu menor teor, à exceção da amostragem a 62 d, diferindo significativamente das sangrias que foram tratadas com sorbato de potássio e com DMDC.

O  $SO_2$  total, por sua vez, também diminuiu, o que se deveu provavelmente, à formação de hidroxissulfonatos (Burton *et al.*, 1963). Além disso, a reação com quinonas pode ter sido outro fator significativo, já que é comum em vinhos tintos, como é o caso da sangria em estudo (Embs e Markakis, 1965). A redução de diquinonas aos seus correspondentes difenóis podem estar associadas com a oxidação de sulfitos a sulfatos (Walker, 1975). Adicionalmente, o dióxido de enxofre (na forma de sulfitos) pode ser oxidado a sulfato, na presença de oxigénio. Essa reação não envolve diretamente o oxigénio, mas está associada com o peróxido de hidrogénio gerado na auto-oxidação de  $\alpha$ -difenóis (Danilewicz, 2007). O fator conservante influenciou neste parâmetro, sendo a sangria tratada com sorbato de potássio, a que apresentou valores superiores de  $SO_2$  total, ao longo do tempo.

Tabela 16 – Resultados de análises físico-químicas de sangrias do ensaio de envelhecimento. Cada parâmetro é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança

Temperatura	t/d	Sangrias	$C_{SO_2 \text{ livre}}$		$C_{SO_2 \text{ total}}$		$AT$		$AV$		pH	$TAV$		$SR$		$\rho_{20^\circ C}$		
			mg/L	±	mg/L	±	mg/L	±	g/L	±		%	±	g/L	±	g/cm <sup>3</sup>	±	
$T_{amb}$	0	Controlo	25,00 <sup>a</sup>	4,30	101,33 <sup>b</sup>	2,87	4,68 <sup>a</sup>	0,45	0,54 <sup>ab</sup>	0,01	3,50 <sup>ab</sup>	0,06	8,34 <sup>a</sup>	0,24	95,69 <sup>a</sup>	1,74	1,033 <sup>a</sup>	0,000
		SP	32,33 <sup>b</sup>	2,87	118,67 <sup>a</sup>	18,63	4,59 <sup>b</sup>	0,08	0,55 <sup>a</sup>	0,01	3,53 <sup>a</sup>	0,14	8,40 <sup>a</sup>	0,02	94,65 <sup>a</sup>	1,67	1,033 <sup>a</sup>	0,000
		DMDC	32,33 <sup>b</sup>	2,87	100,33 <sup>b</sup>	7,17	4,55 <sup>c</sup>	0,07	0,55 <sup>b</sup>	0,01	3,44 <sup>b</sup>	0,01	8,40 <sup>b</sup>	0,08	96,55 <sup>b</sup>	2,18	1,033 <sup>b</sup>	0,000
	31	Controlo	6,00 <sup>a</sup>	4,30	85,33 <sup>b</sup>	10,34	4,99 <sup>a</sup>	0,22	0,55 <sup>ab</sup>	0,01	3,40 <sup>ab</sup>	0,01	9,53 <sup>a</sup>	1,69	80,70 <sup>a</sup>	38,23	1,027 <sup>a</sup>	0,014
		SP	7,00 <sup>b</sup>	4,30	108,00 <sup>a</sup>	0,00	4,81 <sup>b</sup>	0,30	0,54 <sup>a</sup>	0,00	3,46 <sup>a</sup>	0,02	8,73 <sup>a</sup>	0,18	88,80 <sup>a</sup>	12,00	1,031 <sup>a</sup>	0,004
		DMDC	18,00 <sup>b</sup>	0,00	80,33 <sup>b</sup>	7,17	4,90 <sup>c</sup>	0,06	0,54 <sup>b</sup>	0,00	3,40 <sup>b</sup>	0,01	8,34 <sup>a</sup>	0,27	95,31 <sup>b</sup>	1,96	1,033 <sup>b</sup>	0,001
	62	Controlo	13,33 <sup>a</sup>	18,96	86,33 <sup>b</sup>	31,04	4,63 <sup>a</sup>	0,16	0,56 <sup>ab</sup>	0,00	3,42 <sup>ab</sup>	0,08	9,22 <sup>a</sup>	1,46	90,29 <sup>a</sup>	15,54	1,029 <sup>a</sup>	0,011
		SP	8,00 <sup>b</sup>	0,00	102,33 <sup>a</sup>	34,25	4,65 <sup>b</sup>	0,24	0,56 <sup>a</sup>	0,01	3,45 <sup>a</sup>	0,04	8,99 <sup>a</sup>	0,46	88,34 <sup>a</sup>	16,26	1,031 <sup>a</sup>	0,005
		DMDC	7,67 <sup>b</sup>	6,25	71,00 <sup>b</sup>	4,30	4,52 <sup>c</sup>	0,06	0,55 <sup>b</sup>	0,01	3,38 <sup>b</sup>	0,02	8,37 <sup>b</sup>	0,19	90,93 <sup>b</sup>	13,31	1,033 <sup>b</sup>	0,004
	93	Controlo	3,67 <sup>a</sup>	2,87	66,33 <sup>b</sup>	40,13	4,96 <sup>a</sup>	0,85	0,66 <sup>ab</sup>	0,53	3,49 <sup>ab</sup>	0,38	9,96 <sup>a</sup>	0,89	80,08 <sup>a</sup>	30,68	1,026 <sup>a</sup>	0,016
		SP	10,67 <sup>b</sup>	16,90	79,67 <sup>a</sup>	22,93	5,31 <sup>b</sup>	2,17	1,10 <sup>a</sup>	1,89	3,43 <sup>a</sup>	0,03	9,67 <sup>a</sup>	0,70	77,81 <sup>a</sup>	15,59	1,026 <sup>a</sup>	0,008
		DMDC	15,00 <sup>b</sup>	4,30	61,67 <sup>b</sup>	10,03	4,65 <sup>c</sup>	0,18	0,41 <sup>b</sup>	0,02	3,41 <sup>b</sup>	0,06	8,46 <sup>b</sup>	0,10	89,20 <sup>b</sup>	32,85	1,029 <sup>b</sup>	0,016
124	Controlo	3,67 <sup>a</sup>	2,87	94,00 <sup>b</sup>	8,95	4,46 <sup>a</sup>	0,46	0,89 <sup>ab</sup>	0,37	3,52 <sup>ab</sup>	0,22	10,17 <sup>a</sup>	0,56	70,20 <sup>a</sup>	5,93	1,025 <sup>a</sup>	0,017	
	SP	4,33 <sup>b</sup>	2,87	106,67 <sup>a</sup>	7,17	4,41 <sup>b</sup>	0,21	1,14 <sup>a</sup>	0,40	3,45 <sup>a</sup>	0,00	9,73 <sup>a</sup>	0,19	79,40 <sup>a</sup>	1,31	1,025 <sup>a</sup>	0,005	
	DMDC	6,33 <sup>b</sup>	14,33	64,00 <sup>b</sup>	7,45	4,75 <sup>c</sup>	0,55	0,51 <sup>b</sup>	0,15	3,45 <sup>b</sup>	0,39	9,03 <sup>b</sup>	1,39	89,23 <sup>b</sup>	23,60	1,029 <sup>b</sup>	0,011	
30 °C	31	SP	16,67	7,17	68,33	2,87	4,62	0,01	0,42	0,01	3,40	0,01	8,17	0,62	96,88	0,00	1,034	0,001
	62	SP	10,33	6,25	56,00	0,00	4,51	0,20	0,45	0,00	3,42	0,03	8,34	0,04	101,04	0,00	1,034	0,000
	93	SP	10,00	0,00	61,33	11,47	4,36	0,01	0,39	0,08	3,39	0,01	8,33	0,09	104,95	5,28	1,033	0,001
	124	Controlo	5,33 <sup>a</sup>	1,43	48,67 <sup>a</sup>	1,43	4,56 <sup>a</sup>	0,16	0,62 <sup>a</sup>	0,20	3,38 <sup>ab</sup>	0,43	8,21 <sup>a</sup>	3,10	101,84 <sup>a</sup>	17,46	1,030 <sup>a</sup>	0,011
		SP	4,67 <sup>b</sup>	7,17	52,00 <sup>b</sup>	4,30	4,37 <sup>b</sup>	0,17	0,49 <sup>a</sup>	0,05	3,49 <sup>a</sup>	0,17	8,33 <sup>a</sup>	0,09	104,95 <sup>ab</sup>	5,28	1,033 <sup>b</sup>	0,001
	DMDC	7,67 <sup>b</sup>	1,43	58,00 <sup>c</sup>	2,48	4,37 <sup>c</sup>	0,17	0,61 <sup>b</sup>	0,12	3,35 <sup>b</sup>	0,64	8,41 <sup>a</sup>	0,11	107,49 <sup>b</sup>	3,80	1,034 <sup>b</sup>	0,000	
40 °C	31	Controlo	3,00 <sup>a</sup>	0,00	53,00 <sup>b</sup>	16,28	4,21 <sup>a</sup>	1,85	0,54 <sup>ab</sup>	0,01	3,43 <sup>ab</sup>	0,27	8,48 <sup>a</sup>	0,06	96,79 <sup>a</sup>	0,53	1,033 <sup>a</sup>	0,000
		SP	8,67 <sup>b</sup>	2,87	72,33 <sup>a</sup>	14,33	4,58 <sup>b</sup>	0,27	0,55 <sup>a</sup>	0,00	3,45 <sup>a</sup>	0,02	8,44 <sup>a</sup>	0,06	97,08 <sup>a</sup>	2,59	1,033 <sup>a</sup>	0,001
		DMDC	8,67 <sup>b</sup>	2,87	65,00 <sup>b</sup>	13,14	4,52 <sup>c</sup>	0,05	0,55 <sup>b</sup>	0,00	3,41 <sup>b</sup>	0,01	8,45 <sup>b</sup>	0,07	97,35 <sup>b</sup>	1,20	1,034 <sup>b</sup>	0,001
	62	Controlo	7,67 <sup>a</sup>	6,25	47,00 <sup>b</sup>	4,30	4,63 <sup>a</sup>	0,16	0,45 <sup>ab</sup>	0,01	3,42 <sup>ab</sup>	0,08	8,40 <sup>a</sup>	0,07	104,51 <sup>a</sup>	9,07	1,034 <sup>a</sup>	0,001
		SP	5,00 <sup>b</sup>	0,00	58,67 <sup>a</sup>	46,13	4,65 <sup>b</sup>	0,24	0,45 <sup>a</sup>	0,02	3,45 <sup>a</sup>	0,04	8,36 <sup>a</sup>	0,01	89,98 <sup>a</sup>	45,95	1,030 <sup>a</sup>	0,017
		DMDC	7,67 <sup>b</sup>	6,25	64,00 <sup>b</sup>	17,38	4,52 <sup>c</sup>	0,06	0,34 <sup>b</sup>	0,09	3,38 <sup>b</sup>	0,02	8,43 <sup>b</sup>	0,04	105,20 <sup>b</sup>	11,25	1,034 <sup>b</sup>	0,000
	93	Controlo	16,67 <sup>a</sup>	2,87	49,67 <sup>b</sup>	10,03	4,58 <sup>a</sup>	0,17	0,35 <sup>ab</sup>	0,01	3,40 <sup>ab</sup>	0,04	8,48 <sup>a</sup>	0,05	111,37 <sup>a</sup>	3,24	1,033 <sup>a</sup>	0,001
		SP	16,67 <sup>b</sup>	2,87	63,33 <sup>a</sup>	2,87	4,62 <sup>b</sup>	0,02	0,40 <sup>a</sup>	0,01	3,49 <sup>a</sup>	0,11	8,44 <sup>a</sup>	0,05	111,13 <sup>a</sup>	3,15	1,033 <sup>a</sup>	0,000
		DMDC	8,67 <sup>b</sup>	10,03	50,67 <sup>b</sup>	7,17	4,77 <sup>c</sup>	0,20	0,36 <sup>b</sup>	0,05	3,38 <sup>b</sup>	0,01	8,44 <sup>b</sup>	0,02	112,60 <sup>b</sup>	0,00	1,033 <sup>b</sup>	0,000
	124	Controlo	4,33 <sup>a</sup>	2,87	41,00 <sup>b</sup>	7,45	4,37 <sup>a</sup>	0,14	0,55 <sup>ab</sup>	0,01	3,39 <sup>ab</sup>	0,08	8,48 <sup>a</sup>	0,05	97,50 <sup>a</sup>	1,31	1,034 <sup>a</sup>	0,001
		SP	3,00 <sup>b</sup>	0,00	60,67 <sup>a</sup>	14,33	4,39 <sup>b</sup>	0,29	0,56 <sup>a</sup>	0,29	3,51 <sup>a</sup>	0,34	8,49 <sup>a</sup>	0,15	95,83 <sup>a</sup>	7,66	1,033 <sup>a</sup>	0,002
		DMDC	2,00 <sup>b</sup>	4,30	41,00 <sup>b</sup>	0,00	4,39 <sup>c</sup>	0,22	0,51 <sup>b</sup>	0,03	3,34 <sup>b</sup>	0,09	8,44 <sup>b</sup>	0,29	96,70 <sup>b</sup>	1,24	1,033 <sup>b</sup>	0,001

No caso da sangria tratada com DMDC, o teor mais baixo pode ter-se devido à agitação, que foi efetuada na aplicação deste composto. Houve diferenças significativas nas 3 temperaturas estudadas, estando as temperaturas mais elevadas (30 °C e 40 °C) associadas a menores teores de SO<sub>2</sub> total, pois aceleraram as reações de conversão referidas acima.

Quanto à acidez total, expressa em ácido tartárico, o aceitável na maioria dos vinhos situa-se, geralmente, entre 5,5 mg/L e 8,5 mg/L, dependendo da sua origem. Como a sangria corresponde a um vinho diluído, a acidez total apresenta valores mais baixos entre 4,36 mg/L a 5,31 mg/L. O valor mais alto atingido (5,31 mg/L), para uma sangria com sorbato de potássio, mantida a  $T_{amb}$  e durante 93 d, deveu-se à provável ocorrência de refermentação, o que é indicado pelo teor elevado da acidez volátil (1,10 g/L). Aos 124 d, a 20 °C, uma sangria com sorbato de potássio também apresentou uma acidez volátil de 1,14 g/L; no entanto, o valor de acidez total dessa sangria não se encontra em conformidade, isto porque na acidez total também é contabilizado o ácido acético. Os teores de ácido acético no vinho (antes da fermentação maloláctica) são à volta de 0,25 g/L (Etiévant, 1991). O seu limite máximo legal expresso como ácido acético é de 1,2 g/L [Reg. (CE) n° 606/2009]. Concentrações acima de 0,8 g/L podem conferir ao vinho um sabor ácido prejudicial (odor a vinagre) (Bely *et al.*, 2003). À exceção das sangrias conservadas com sorbato de potássio a  $T_{amb}$ , ao fim de 93 d (1,10 g/L) e 124 d (1,14 g/L), e da sangria testemunha (controlo) a  $T_{amb}$ , após 124 d, (0,89 g/L), as outras apresentam teores aceitáveis de acidez volátil.

O fator conservante e o fator temperatura influenciaram a acidez volátil e apenas o fator temperatura (entre  $T_{amb}$  e 40 °C) afetou a acidez total. A  $T_{amb}$  ocorreu, provavelmente refermentação em sangrias controlo e com sorbato de potássio, o que fez aumentar a acidez volátil e, por sua vez, a acidez total. A sangria tratada com DMDC foi a que manteve a acidez volátil mais constante ao longo do tempo, diferenciando-se significativamente da sangria tratada com SP a  $T_{amb}$ , 30 °C e 40 °C, e da sangria controlo a 30 °C. No caso da acidez total, relativamente ao fator conservante não ocorreram diferenças significativas.

Uma gama de pH entre 3,1 e 3,4 é indicada para os vinhos brancos, e entre 3,3 e 3,6 para a maioria dos vinhos tintos. Tal como referido, a disponibilidade de SO<sub>2</sub> e, a sua fração molecular, depende do pH, da temperatura e de *TAV*. O pH das sangrias situa-se geralmente entre 3,34 e 3,54, valores que vão ao encontro do esperado (dentro do intervalo para um vinho tinto). Neste intervalo de pH, e tendo em conta este fator isolado, a espécie *Oenococcus oeni* consegue crescer, pois são inibidas a valores de pH entre 2,9 e 3,0 (Jackson, 2008). Os valores pH das sangrias com SP e DMDC, a  $T_{amb}$  e 40 °C foram significativamente diferentes.

Relativamente ao teor de substâncias redutoras, verificou-se que a  $T_{amb}$  houve em algumas sangrias controlo e com sorbato de potássio diminuição devido à existência de refermentação. Para as sangrias tratadas com o conservante DMDC, apenas se verificou uma ligeira refermentação aos 124 d. Este conservante, foi portanto, o que apresentou maior espectro de ação, ao longo do tempo do estudo. Renouf *et al.* (2008) referem que 50 mg/L de DMDC juntamente com 25 mg/L de  $SO_2$  livre são suficientes para proporcionar um controlo microbiano eficiente. A partir do tempo zero, os valores de  $SO_2$  livre são abaixo de 25 mg/L e apesar da quantidade de DMDC ter sido 200 mg/L, não foi suficiente para a eficácia do conservante. Além disso, as sangrias foram filtradas apenas a 1  $\mu m$ . Por outro lado, como o DMDC é pouco solúvel em água e possui um elevado ponto de fusão, a sua aplicação em laboratório é dificultada. Renee Terrell *et al.* (1993) observaram que o DMDC foi mais eficaz do que combinações de  $SO_2$  e/ou ácido sórbico na prevenção de fermentação de mosto a temperaturas mais elevadas. Neste estudo com sangrias a combinação DMDC/ $SO_2$  foi, ainda assim, a mais eficiente.

Apesar de tudo, a fermentação só ocorreu a  $T_{amb}$ . Para as temperaturas mais elevadas verificou-se um aumento de substâncias redutoras em relação ao valor inicial, o que pode dever-se ao facto de alguma sacarose presente no mosto concentrado retificado usado (MCR), ter sido convertida em glucose e frutose. O consumo de substâncias redutoras nas amostras que sofreram fermentação, por sua vez, levou a um aumento de  $TAV$ . Segundo Jones e Ough (1985), embora muitos fatores influenciem a conversão de açúcar em etanol, 17 g de glucose, produzem cerca de 10 mL de etanol, o que equivale a um  $TAV$  de 1 %. Este facto aconteceu, aproximadamente na sangria controlo a  $T_{amb}$ , depois de 31 d de armazenamento, pois houve consumo de 14,99 g de açúcar e o  $TAV$  subiu 1,2 %. Nas restantes, não foi unânime a conversão, o que poderá dever-se ao erro associado à determinação do teor de substâncias redutoras ( $\pm 10$  g). Os valores de substâncias redutoras e, por sua vez, de  $TAV$ , diferiram significativamente entre as sangrias com DMDC, comparativamente à sangria controlo e tratada com SP e entre as sangrias, a  $T_{amb}$  e 40 °C. A 30 °C houve diferenças significativas em relação às outras temperaturas em estudo e a 30 °C, apenas a sangria com DMDC, se distanciou da do controlo, uma vez que, só ocorreu fermentação aos 124 d, tal como foi referido.

Tendo em conta os diversos parâmetros que podem funcionar como barreira ao crescimento microbiano, nomeadamente, apresentados na Tabela 16, conservantes incluindo o  $SO_2$ , pH, acidez total e  $TAV$  é importante verificar se são suficientes para o controlo de bactérias e leveduras indesejáveis. Em relação ao  $SO_2$  molecular, os valores mais altos atingidos foram no tempo zero para as sangrias tratadas com SP e tratadas com DMDC (0,6 mg/L), pois ao pH de 3,50 só está disponível cerca de 2 % do  $SO_2$  livre. O género *Brettanomyces* pode ser controlado com níveis de  $SO_2$  moleculares

de 0,8 mg/L (Du Toit *et al.*, 2005) e outras leveduras, tais como as do género *Zygosaccharomyces* são tolerantes a níveis muito mais elevados de SO<sub>2</sub> molecular, até 2 mg/L (Warth, 1985). As leveduras deste género são consideradas particularmente perigosas, pois são resistentes a *TAV* elevado, SO<sub>2</sub> e sorbatos (Thomas e Davenport, 1985). Posto isto, no caso das sangrias é necessário um controlo antecipado na produção de vinho, de forma a prevenir o aparecimento de leveduras do género *Zygosaccharomyces*.

Chatonnet *et al.* (1995) relataram que 275 mg/L de açúcar seriam suficientes para apoiar o crescimento de leveduras do género *Brettanomyces* e causar a deterioração do vinho. Além disso, esta levedura pode usar etanol como única fonte de carbono e energia. Do mesmo modo é necessário também atuar na prevenção do aparecimento de leveduras do género *Brettanomyces*.

As melhores estratégias para controlar o crescimento de bactérias acéticas, correspondem à minimização da exposição do vinho ao oxigénio, bem como a manutenção de um pH baixo <3,50 (Du Toit e Lambrechts, 2002), de temperaturas baixas (Joyeux *et al.*, 1984), e de níveis de SO<sub>2</sub> molecular adequados, entre 0,7 mg/L e 1 mg/L (Du Toit e Pretorius, 2002). De acordo com isto, o pH da sangria é adequado, ao contrário do teor de SO<sub>2</sub> livre.

Em relação aos conservantes, o sorbato de potássio previne o crescimento de leveduras e não afeta bactérias (Fugelsand e Edwards, 2007). Por outro lado, segundo o estudo de Delfini *et al.* 2002 e Costa *et al.* (2008) as bactérias lácticas em vinhos ou em sumos foram mais resistentes ao DMDC do que leveduras e que os limites de concentração autorizados de DMDC em vinhos (200 mg/L) não foram eficazes para bactérias lácticas e acéticas, sendo necessária uma concentração superior a 1000 mg/L para evitar o seu crescimento. Costa *et al.* (2008) referiram a falta de eficiência em culturas puras, bem como em populações indígenas, antes do engarrafamento. Em contrapartida, segundo Divol *et al.* (2005), o DMDC pode ser eficaz para parar a fermentação alcoólica, mesmo em concentrações baixas (100 mg/L). Para uma estabilidade duradoura, o nível mais eficaz de DMDC foi de 200 mg/L. No entanto, para evitar a oxidação do vinho e para o preservar contra contaminações ou reativação de certas leveduras, a adição de SO<sub>2</sub> foi essencial. Neste trabalho, como aos 124 d o teor de SO<sub>2</sub> molecular foi baixo (0,04 mg/L a 0,09 mg/L), a existência de fermentação nas sangrias conservadas com DMDC, poderá ser explicada pela reativação de certas leveduras. Isto porque, o DMDC atua, hidrolisa-se e não deixa efeitos residuais.

#### 4.2.1.1 Cor

Neste subcapítulo são apresentados os resultados da medição das coordenadas de cor do espaço CIELab nas sangrias sujeitas ao processo de envelhecimento, durante 4 meses (124 d) (Tabela 17).

Tabela 17 – Coordenadas de cor de sangrias do ensaio de envelhecimento sem (controlo) e com conservantes (DMDC e SP). Para cada coordenada de cor é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança

Temperatura	t/d	Sangrias	L*	±	a*	±	b*	±	C*	±	H*	±	Cor	
T <sub>amb</sub>	0	Controlo	28,67 <sup>a</sup>	1,65	60,69 <sup>b</sup>	2,84	-18,19 <sup>a</sup>	2,28	63,33 <sup>b</sup>	3,16	-0,29 <sup>a</sup>	0,03		
		DMDC	32,27 <sup>b</sup>	1,86	60,05 <sup>a</sup>	3,19	-23,43 <sup>b</sup>	2,40	64,47 <sup>a</sup>	3,90	-0,37 <sup>b</sup>	0,02		
		SP	32,37 <sup>c</sup>	1,41	55,28 <sup>b</sup>	3,39	-23,94 <sup>c</sup>	4,22	60,23 <sup>b</sup>	4,75	-0,41 <sup>c</sup>	0,04		
	31	Controlo	17,57 <sup>a</sup>	1,71	51,86 <sup>b</sup>	1,54	1,32 <sup>a</sup>	4,64	51,90 <sup>b</sup>	1,51	0,03 <sup>a</sup>	0,09		
		DMDC	26,90 <sup>b</sup>	1,45	59,30 <sup>a</sup>	1,30	-15,36 <sup>b</sup>	1,78	61,27 <sup>a</sup>	1,62	-0,25 <sup>b</sup>	0,03		
		SP	20,08 <sup>c</sup>	1,56	54,56 <sup>b</sup>	2,48	-3,17 <sup>c</sup>	0,73	54,63 <sup>b</sup>	2,58	-0,06 <sup>c</sup>	0,00		
	62	Controlo	20,97 <sup>a</sup>	19,71	53,50 <sup>b</sup>	14,03	0,87 <sup>a</sup>	30,68	54,43 <sup>b</sup>	15,21	0,03 <sup>a</sup>	0,54		
		DMDC	26,69 <sup>b</sup>	4,10	56,66 <sup>a</sup>	7,15	-2,86 <sup>b</sup>	4,87	56,73 <sup>a</sup>	7,38	-0,05 <sup>b</sup>	0,09		
		SP	19,15 <sup>c</sup>	1,51	52,84 <sup>b</sup>	2,80	5,08 <sup>c</sup>	2,95	53,10 <sup>b</sup>	2,58	0,10 <sup>c</sup>	0,06		
	93	Controlo	13,46 <sup>a</sup>	3,60	48,76 <sup>b</sup>	5,81	-0,33 <sup>a</sup>	6,25	48,80 <sup>b</sup>	5,85	0,00 <sup>a</sup>	0,14		
		DMDC	26,19 <sup>b</sup>	1,60	58,76 <sup>a</sup>	0,82	-6,08 <sup>b</sup>	2,89	59,07 <sup>a</sup>	1,00	-0,10 <sup>b</sup>	0,04		
		SP	14,98 <sup>c</sup>	3,56	50,19 <sup>b</sup>	6,59	-0,52 <sup>c</sup>	10,22	50,30 <sup>b</sup>	6,45	-0,01 <sup>c</sup>	0,21		
	124	Controlo	12,37 <sup>a</sup>	1,99	45,47 <sup>b</sup>	2,75	0,72 <sup>a</sup>	3,79	45,53 <sup>b</sup>	2,73	0,02 <sup>a</sup>	0,08		
		DMDC	16,28 <sup>b</sup>	12,87	48,45 <sup>a</sup>	8,31	2,35 <sup>b</sup>	7,20	48,57 <sup>a</sup>	8,19	0,05 <sup>b</sup>	0,15		
		SP	13,63 <sup>c</sup>	0,17	47,12 <sup>b</sup>	0,47	-1,52 <sup>c</sup>	3,83	47,13 <sup>b</sup>	0,62	-0,03 <sup>c</sup>	0,08		
	30 °C	31	Controlo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
			DMDC	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
			SP	28,00	1,13	58,10	1,71	-7,71	5,90	58,64	2,50	-0,13	0,10	
62		Controlo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		DMDC	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		SP	24,76	0,85	53,61	0,83	-4,64	1,84	53,81	0,89	-0,09	0,03		
93		Controlo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		DMDC	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		SP	25,17	1,91	50,70	2,19	-2,40	2,11	50,76	2,27	-0,05	0,04		
124		Controlo	21,71 <sup>a</sup>	11,41	48,53 <sup>b</sup>	5,34	0,10 <sup>a</sup>	10,72	48,66 <sup>b</sup>	5,04	0,00 <sup>a</sup>	0,23		
		DMDC	24,59 <sup>b</sup>	1,14	50,41 <sup>a</sup>	1,10	-1,63 <sup>b</sup>	2,25	50,44 <sup>a</sup>	1,16	-0,03 <sup>b</sup>	0,04		
		SP	26,74 <sup>c</sup>	1,31	51,43 <sup>b</sup>	1,28	-2,87 <sup>c</sup>	1,76	51,51 <sup>b</sup>	1,34	-0,06 <sup>c</sup>	0,03		
40 °C		31	Controlo	26,79 <sup>a</sup>	0,17	50,09 <sup>b</sup>	1,34	0,85 <sup>a</sup>	4,53	50,12 <sup>b</sup>	1,34	0,02 <sup>a</sup>	0,08	
			DMDC	25,26 <sup>b</sup>	4,08	53,10 <sup>a</sup>	6,56	-2,79 <sup>b</sup>	8,79	53,24 <sup>a</sup>	7,12	-0,05 <sup>b</sup>	0,16	
			SP	29,08 <sup>c</sup>	1,09	49,14 <sup>b</sup>	2,82	-1,64 <sup>c</sup>	3,56	49,18 <sup>b</sup>	2,92	-0,03 <sup>c</sup>	0,06	
		62	Controlo	28,93 <sup>a</sup>	0,56	45,78 <sup>b</sup>	0,97	17,35 <sup>a</sup>	3,04	48,96 <sup>b</sup>	0,38	0,36 <sup>a</sup>	0,07	
			DMDC	28,09 <sup>b</sup>	2,74	48,12 <sup>a</sup>	3,22	8,49 <sup>b</sup>	4,97	48,89 <sup>a</sup>	2,68	0,17 <sup>b</sup>	0,11	
			SP	29,21 <sup>c</sup>	6,81	45,17 <sup>b</sup>	0,42	16,22 <sup>c</sup>	3,52	48,00 <sup>b</sup>	1,33	0,34 <sup>c</sup>	0,06	
93	Controlo	26,73 <sup>a</sup>	1,96	42,66 <sup>b</sup>	2,10	24,88 <sup>a</sup>	5,08	49,42 <sup>b</sup>	0,80	0,53 <sup>a</sup>	0,10			
	DMDC	28,07 <sup>b</sup>	0,88	44,91 <sup>a</sup>	1,71	15,25 <sup>b</sup>	5,42	47,45 <sup>a</sup>	3,02	0,32 <sup>b</sup>	0,10			
	SP	30,19 <sup>c</sup>	0,67	43,08 <sup>b</sup>	0,15	23,23 <sup>c</sup>	3,38	48,95 <sup>b</sup>	1,63	0,49 <sup>c</sup>	0,06			
124	Controlo	22,10 <sup>a</sup>	1,09	39,97 <sup>b</sup>	0,78	30,13 <sup>a</sup>	2,04	50,06 <sup>b</sup>	1,14	0,65 <sup>a</sup>	0,04			
	DMDC	23,13 <sup>b</sup>	1,26	40,72 <sup>a</sup>	0,89	25,25 <sup>b</sup>	2,07	47,92 <sup>a</sup>	0,84	0,55 <sup>b</sup>	0,04			
		SP	23,87 <sup>c</sup>	2,75	38,95 <sup>b</sup>	1,90	30,50 <sup>c</sup>	2,27	49,47 <sup>b</sup>	2,71	0,66 <sup>c</sup>	0,03		

\* não foi medido.

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), em relação ao fator conservante.

As cores aqui apresentadas para as sangrias podem não traduzir com exatidão as cores reais devido à impressão.

Uma vez que também foi realizada a determinação da cor, ao longo do tempo, de mês a mês, os dados foram submetidos a uma análise de variância, Anova de medidas repetidas. Neste caso, tal como nas análises físico-químicas, como existem três fatores a variarem, nomeadamente o tempo, a temperatura e o conservante, as letras indicativas de diferenças significativas apenas se referem ao conservante.

A partir da análise de variância de medidas repetidas, verificaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as coordenadas ao longo do tempo, nas sangrias com diferentes conservantes e nas temperaturas testadas. As coordenadas de cor foram, então, influenciadas pelo fator tempo, conservante e temperatura. Ao avaliar os três fatores em simultâneo, apenas para a coordenada  $a^*$  (verde/ vermelho), não se encontram diferenças significativas.

Relativamente ao fator conservante, em particular, verificaram-se diferenças significativas nas coordenadas  $L^*$ ,  $b^*$  e  $H^*$ . O fator temperatura influenciou em todas as coordenadas avaliadas.

Em todas as amostras de sangria, ao longo do tempo, a coordenada  $L^*$  diminuiu, isto é, as amostras escureceram, o que foi mais notório na sangria sem conservante (controlo) (de 28,67, no tempo 0 d, para 12,37, depois de 124 d). As sangrias com DMDC foram as que escureceram menos (16,28 depois de 124 d a  $T_{amb}$ ). O facto da coordenada  $L^*$  ter diminuído, pode ser o resultado do desenvolvimento de reações de escurecimento, que conduzem à formação de polímeros de castanho avermelhado nos vinhos (Chaves *et al.*, 2007).

A coordenada  $a^*$  (verde/ vermelho) diminuiu, ao longo do tempo, devido à diminuição do conteúdo de antocianinas, provavelmente causada pela sua interação com outros compostos presentes nas sangrias, em condições oxidantes (Alañón *et al.*, 2013). A sangria tratada com DMDC demonstrou ser significativamente diferente da sangria controlo e da sangria com sorbato de potássio, com um valor de 48,45 para a coordenada  $a^*$  após 124 d, a  $T_{amb}$ .

Por outro lado, para o mesmo tempo de conservação, à mesma temperatura ( $T_{amb}$ ), a sangria controlo apresenta um valor de 45,47 e a sangria com sorbato de potássio o valor de 47,12. A 40 °C, após 124 d a sangria controlo teve o valor de coordenada  $a^*$  de 39,97, a sangria com DMDC 40,72 e a sangria com sorbato de potássio 38,95. Todas as sangrias tiveram valores positivos de coordenada  $a^*$ , o que dá indicação de cor vermelha.

O DMDC, por permitir que as sangrias apresentem valores superiores da coordenada de cor  $a^*$  foi, portanto, o melhor conservante na preservação da cor vermelha, para ambas as temperaturas.

A saturação ( $C^*$ ) também diminuiu em todas as sangrias, durante o envelhecimento. Tal facto deveu-se, provavelmente à formação de pigmentos polimerizados, como um resultado de uma mistura mais complexa de pigmentos envolvidos na cor “bordô” de vinho tinto (Alañón *et al.*, 2013). A sangria DMDC também foi a que obteve, significativamente, maior saturação no fim do envelhecimento (124 d), com o valor de 48,57 a  $T_{amb}$  e para a sangria controlo, esse facto sucedeu-se a 40 °C, com o valor de 50,06. A coordenada  $b^*$  (azul/amarelo) e a tonalidade ( $H^*$ ) aumentaram em todas as sangrias ao longo do tempo devido à formação de pigmentos amarelo-laranja (Pérez-Magarino & González-San José, 2004). Para a coordenada  $b^*$ , houve diferenças significativas entre todas as sangrias, sendo o sorbato de potássio o conservante que funcionou melhor, com -1,52 a  $T_{amb}$ , indicando ainda a tonalidade azul, o que é demonstrado pelo valor negativo. Pelo contrário, à temperatura de 40 °C, a sangria tratada com DMDC foi a que menos envelheceu, o que foi comprovado pelo valor mais baixo de tonalidade, 25,25, em comparação com o valor de 30,13 para o controlo, e 30,50 para a sangria tratada com sorbato de potássio.

Na coordenada  $H^*$  ocorreram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em todas as sangrias, e neste caso, também a sangria com sorbato de potássio, obteve um valor acima das restantes, a  $T_{amb}$  (-0,03). Para a temperatura de 40 °C, a sangria com DMDC demonstrou ter tonalidade menos amarelada (0,55), em relação à sangria controlo (0,65) e à sangria com sorbato de potássio (0,66). Os valores de tonalidade mais elevados indicam a contribuição de outros pigmentos diferentes das antocianinas, que normalmente envolvem a possível formação de piranoantocianinas (Álvarez *et al.*, 2006). Isso resulta em tons vermelho-laranja típicos dos vinhos rosados.

A fim de determinar se as mudanças observadas nos parâmetros cromáticos poderiam ser visualmente relevantes, foram também calculadas as diferenças de cor ( $\Delta E^*$ ) entre os tempos 0 d e 31 d, 31 d e 62 d, 62 d e 93 d e 93 d e 124 d, das sangrias envelhecidas às três temperaturas (Tabela 18). Neste caso, também foi utilizada uma análise de variância (Anova) de medidas repetidas para identificar diferenças entre os produtos. Verificaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo, na diferença total de cor das sangrias ( $\Delta E^*$ ) apenas nas temperaturas testadas.

À temperatura ambiente, a sangria com sorbato de potássio foi a que obteve valores mais baixos, à exceção do tempo entre 62 d e 93 d e entre 93 d e 124 d. Entre 62 d e 93 d, a sangria com DMDC foi a que possuiu um  $\Delta E^*$  mais baixo (4,21). Entre 93 d e 124 d, a sangria controlo obteve a menor diferença de cor, em relação às outras sangrias, em todas as temperaturas, com um  $\Delta E^*$  de 3,68. Isto, não era de esperar visto que, esta sangria não contém qualquer tipo de conservante.

À temperatura de 30 °C, a sangria com sorbato de potássio obteve valores cada vez mais baixos de  $\Delta E^*$ , ao longo do tempo.

Tabela 18 –Diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) de sangrias do ensaio de envelhecimento com diferentes conservantes à  $T_{amb}$ , 30 °C e 40 °C, para diferentes intervalos de tempo ( $\Delta t$ ). Para cada ( $\Delta E^*$ ) é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança

Sangrias	$\Delta t$	$\Delta E^*$					
		$T_{amb}$	$\pm$	30 °C	$\pm$	40 °C	$\pm$
Controlo		24,13 <sup>a</sup>	1,87	*	*	21,87 <sup>a</sup>	5,89
DMDC	31 d – 0 d	9,80 <sup>a</sup>	4,78	*	*	22,97 <sup>a</sup>	14,57
SP		24,22 <sup>a</sup>	5,68	17,08	5,1	23,38 <sup>a</sup>	8,35
Controlo		13,04 <sup>a</sup>	21,1	*	*	17,2 <sup>a</sup>	6,72
DMDC	62 d – 31 d	12,92 <sup>a</sup>	4,89	*	*	12,92 <sup>a</sup>	12,8
SP		8,63 <sup>a</sup>	5,01	6,53	3,14	18,42 <sup>a</sup>	0,96
Controlo		13,53 <sup>a</sup>	19,12	*	*	8,49 <sup>a</sup>	6,47
DMDC	93 d – 62 d	4,21 <sup>a</sup>	5,81	*	*	7,88 <sup>a</sup>	8,47
SP		8,98 <sup>a</sup>	2,01	3,8	1,84	7,83 <sup>a</sup>	3,81
Controlo		3,68 <sup>a</sup>	6,7	*	*	7,54 <sup>a</sup>	4,01
DMDC	124 d – 93 d	16,69 <sup>a</sup>	17,66	*	*	12,0 <sup>a</sup>	6,35
SP		4,78 <sup>a</sup>	4,52	2,27	3,62	10,49 <sup>a</sup>	3,24
Controlo		29,26 <sup>a</sup>	6,76	*	*	31,35 <sup>a</sup>	5,92
DMDC	124 d – 0 d	32,66 <sup>a</sup>	18,25	*	*	30,77 <sup>a</sup>	13,10
SP		30,37 <sup>a</sup>	7,81	18,04	5,45	34,13 <sup>a</sup>	3,67

\* não foi medido.

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), em relação ao fator conservante.

À temperatura de 40 °C, a sangria tratada com DMDC teve 30,77, tendo em conta o  $\Delta E^*$  entre a leitura inicial e depois dos 124 d. Apesar do valor da diferença de cor ser mais baixo, relativamente à sangria controlo e à sangria com sorbato de potássio, o erro associado é superior. Posto isto e tendo em conta o erro associado, a sangria controlo demonstrou ser a sangria que teve menores alterações de cor. Sabe-se que se  $\Delta E^*$  obtiver valores superiores a 3 unidades existe a possibilidade das diferenças de cor serem perceptíveis pelo olho humano (Martinez *et al.*, 2001). Por outro lado, se a condição  $1 < \Delta E^* < 2$  se verificar, as pessoas experientes conseguem detetar as diferenças de cor entre produtos e se,  $2 < \Delta E^* < 3,5$ , mesmo as pessoas menos experientes conseguem detetar. A partir de valores de  $\Delta E^*$  acima de 3,5, as diferenças são claramente evidentes (Mokrzycki e Tatol, 2012). Tendo em conta isto, todas as diferenças de cor obtidas estão acima de 2 e, por isso, são perceptíveis as diferenças pelo consumidor.

#### 4.2.2 Compostos Voláteis

Foram quantificados por GC-MS alguns compostos voláteis do aroma às sangrias sujeitas ao processo de envelhecimento, nomeadamente ésteres, ácidos gordos voláteis, terpenos, fenóis voláteis, aldeídos e ainda o *trans,trans*-2,4-hexadien-1-ol. Os resultados das concentrações médias desses compostos encontram-se na Tabela 19 (a  $T_{amb}$ ) e na Tabela 20 (a 40 °C). Na Figura IV.1 estão presentes exemplos de cromatogramas da análise das sangrias com DMDC no tempo zero a  $T_{amb}$  e depois de 124 d a essa temperatura e a 40 °C.

No geral, os compostos com maior contributo para o aroma das sangrias foram os ésteres, alguns ácidos gordos voláteis e um dos terpenos, o linalol. Os fenóis voláteis e os aldeídos estavam presentes em concentrações muito inferiores ao seu limiar de perceção olfativo.

Os ésteres etílicos de ácidos gordos e os acetatos de álcoois superiores fornecem carácter frutado às sangrias (resultam da fermentação alcoólica do vinho de base), sendo que a sua concentração decresce durante o processo de conservação e envelhecimento (Oliveira *et al.*, 2008).

Entre os ésteres, os que mais se destacaram foram o butirato de etilo (aroma a papaia, a manteiga, a maçã, adocicado e perfumado), o hexanoato de etilo (aroma a maçã, frutado e adocicado), o octanoato de etilo (aroma a maçã, frutado e adocicado) e o acetato 3-metil-1-butilo (aroma a banana) (Vilanova e Oliveira, 2012). Em relação ao butirato de etilo, a sangria com SP foi a que apresentou concentrações superiores para ambas as temperaturas. Por outro lado, o hexanoato de etilo foi superior nas sangrias com DMDC, em relação às sangrias controlo e nas sangrias com SP, principalmente a  $T_{amb}$ . No caso do acetato 3-metil-1-butilo e do octanoato de etilo em todas as sangrias em estudo as suas concentrações foram semelhantes, em ambas as temperaturas. Ao longo do tempo era esperado que houvesse um decréscimo progressivo (Oliveira *et al.*, 2008). No entanto, isso não se verificou, havendo oscilações da concentração, o que pode ter sido devido à ocorrência de fermentação, o que foi comprovado pelas análises físico-químicas das sangrias com SP e controlo. Nas sangrias com DMDC essa oscilação também ocorreu mas a origem é desconhecida. Contudo, tratando-se de triplicados de 3 garrafas diferentes, o erro associado à concentração média tende a ser superior.

Os ésteres etílicos de ácidos fixos (lactato de etilo e succinato de dietilo) aumentam com a idade (Oliveira *et al.*, 2008). Podem ser, portanto, marcadores de idade. Em todas as sangrias a sua concentração esteve sempre abaixo do *LPO*. Mas o seu aumento não foi gradual ao longo do tempo, pois ocorreram oscilações, tal como se sucedeu nos ésteres etílicos de ácidos gordos e nos acetatos de álcoois superiores.

Tabela 19 – Concentrações médias ( $C$ ) dos compostos voláteis selecionados para avaliação da sua evolução ao longo de 4 meses nas sangrias, a  $T_{amb}$ , e respetivo limiar de perceção olfativo ( $LPO$ ). Para cada composto é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança.

Compostos	$LPO$ μg/L	$T_{amb}$																													
		0 d						31 d						62 d						93 d						124 d					
		Controlo		SP		DMDC		Controlo		SP		DMDC		Controlo		SP		DMDC		Controlo		SP		DMDC		Controlo		SP		DMDC	
<b>Ésteres</b>		$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$	$C$
<b>Ésteres etílicos de ácidos gordos</b>		μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±	μg/L	±
Butirato de etilo	20 (a)	19	69	34	72	23	46	71	99	204	135	27	80	75	63	5	74	151	86	32	97	34	83	19	70	14	78	25	51	37	53
Hexanoato de etilo	14 (c)	79	10	77	20	70	13	82	167	73	93	112	10	73	137	86	27	128	51	102	48	95	31	171	37	74	4	78	31	77	52
Octanoato de etilo	5 (c)	128	33	107	54	99	61	206	123	189	136	224	103	157	216	187	69	231	81	287	97	211	7	321	85	148	30	140	62	110	27
Decanoato de etilo	200 (c)	82	45	71	44	57	35	153	43	173	90	145	61	130	135	167	68	161	55	143	31	111	74	138	27	57	23	44	57	31	18
<b>Acetatos de álcoois superiores</b>																															
Acetato de 3-metil-1-butilo	30 (b)	210	14	204	43	198	27	621	1603	219	134	250	38	162	108	186	79	247	103	146	148	285	397	265	32	120	19	173	190	195	36
Acetato de 2-feniletilo	250 (b)	32	7	32	10	31	8	94	217	35	49	41	14	35	24	38	12	43	18	28	47	42	17	42	6	38	15	23	39	42	23
<b>Ésteres etílicos de ácidos fixos</b>																															
Lactato de etilo	14 000 (d)	878	524	1036	161	928	661	2430	1107	2980	2101	2268	1153	1276	329	1370	817	1898	1300	2304	594	2328	573	2579	778	2791	174	2605	1244	2509	768
Sucinato de dietilo	100 000 (b)	3461	370	3601	589	3478	437	4485	1089	4708	2001	4788	601	3600	2748	4279	1347	4888	1927	4809	804	4977	1433	4899	992	5459	657	4960	2638	4824	605
<b>Ácidos Gordos voláteis</b>																															
Ácido 2+3-metilbutírico	33,4 (c)	33	19	44	11	32	27	59	31	97	99	57	25	34	16	40	27	48	35	46	5	57	52	60	21	49	13	55	24	48	26
Ácido Hexanoíco	420 (c)	194	61	250	64	181	83	346	127	387	175	281	101	188	93	233	103	249	147	304	35	316	121	285	2	350	2	308	172	263	61
Ácido Octanoíco	500 (c)	604	192	710	204	596	19	873	366	813	392	752	109	581	423	811	201	659	171	714	27	847	211	686	103	740	51	761	382	552	71
<b>Terpenos</b>																															
Linalol	25,2 (c)	61	3	64	10	60	9	62	16	60	29	70	8	47	37	54	7	64	25	52	15	56	15	53	10	45	3	41	25	35	8
α-terpineol	250 (c)	34	6	39	5	28	5	37	23	34	35	30	3	44	48	52	11	36	16	56	24	57	3	37	5	58	18	54	27	40	11
<b>Fenóis voláteis</b>																															
4-etilguaicol	47 (e)	12	1	13	4	12	4	14	4	16	5	13	9	53	180	15	3	16	5	16	2	18	7	17	3	15	6	13	7	11	5
4-etilfenol	440 (e)	51	9	45	10	51	13	72	22	59	23	80	19	54	39	52	19	73	31	74	12	54	34	77	17	76	26	56	5	88	41
<b>Aldéidos</b>																															
Furfural	15 000 (e)	10	10	10	6	7	4	3	2	12	12	18	10	2	7	1	2	25	14	4	3	4	10	37	23	11	5	5	4	25	59
5-hidroximetilfurfural	16 000 (e)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4	7	30	64	1	0	1	2	1	1	2	1	2	2	3	1	3	2	6	2	7	10	17	51
<b>Outros</b>																															
<i>trans,trans</i> -2,4-Hexadien-1-ol		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd – Não detetado, em nenhuma das réplicas. (a) – Guth, 1997a; (b) – Moreno *et al.*, 2005; (c) – Ferreira *et al.*, 2000; (d) – Siebert *et al.*, 2005; (e) Boidron *et al.*, 1988.

Tabela 20 – Concentrações médias (*C*) dos compostos voláteis selecionados para avaliação da sua evolução ao longo de 4 meses nas sangrias, a 40 °C, e respetivo limiar de perceção olfativo (*LPO*). Para cada composto é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança.

Compostos	<i>LPO</i> µg/L	40 °C																													
		0 d						31 d						62 d						93 d						124 d					
		Controlo	SP	DMDC				Controlo	SP	DMDC				Controlo	SP	DMDC				Controlo	SP	DMDC				Controlo	SP	DMDC			
<b>Ésteres</b>		<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±	<i>C</i>	±
<b>Ésteres etílicos de ácidos gordos</b>		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L		µg/L	
Butirato de etilo	20 (a)	19	69	34	72	23	46	13	66	23	64	23	41	25	44	18	46	5	36	19	34	30	53	42	57	44	25	59	16	44	2
Hexanoato de etilo	14 (c)	79	10	77	20	70	13	107	30	117	33	80	33	121	29	113	20	103	36	161	54	145	19	191	72	123	25	123	44	122	40
Octanoato de etilo	5 (c)	128	33	107	54	99	61	55	40	76	23	37	33	108	22	106	53	98	34	230	77	233	17	247	162	122	21	117	67	100	50
Decanoato de etilo	200 (c)	82	45	71	44	57	35	4	4	4	3	4	9	5	6	7	2	14	14	12	22	23	23	20	23	9	3	11	15	8	12
<b>Acetatos de álcoois superiores</b>																															
Acetato de 3-metil-1-butilo	30 (b)	210	14	204	43	198	27	129	36	138	26	147	45	87	12	90	35	65	101	75	20	74	8	108	30	61	8	65	22	73	17
Acetato de 2-feniletilo	250 (b)	32	7	32	10	31	8	18	2	21	6	25	8	9	2	11	5	17	7	6	0	7	2	13	6	3	1	4	2	7	3
<b>Ésteres etílicos de ácidos fixos</b>																															
Lactato de etilo	14 000 (d)	878	524	1036	161	928	661	2998	2027	2757	1660	2683	1433	3358	2220	2384	681	2131	1154	2788	1373	2528	488	3640	2285	3739	1407	3320	1768	3223	2927
Sucinato de dietilo	100 000 (b)	3461	370	3601	589	3478	437	5658	1446	6202	713	4928	1147	6384	887	5819	732	5613	884	7021	1366	6737	1048	8013	3383	7540	819	7606	2412	6995	1026
<b>Ácidos Gordos voláteis</b>																															
Ácido 2+ 3-metilbutírico	33,4 (c)	33	19	44	11	32	27	54	38	61	27	51	17	56	43	49	16	39	8	50	28	52	15	66	29	54	25	71	31	51	50
Ácido Hexanoíco	420 (c)	194	61	250	64	181	83	271	104	303	43	245	54	256	76	246	31	230	86	246	89	243	82	295	118	244	26	280	92	242	102
Ácido Octanoíco	500 (c)	604	192	710	204	596	19	739	60	854	55	690	233	677	48	784	257	693	56	742	145	757	172	749	299	635	80	752	287	558	53
<b>Terpenos</b>																															
Linalol	25,2 (c)	61	3	64	10	60	9	0	0	0	0	7	14	nd					nd							nd					
α-terpineol	250 (c)	34	6	39	5	28	5	93	22	112	9	57	25	53	23	50	85	47	17	35	9	46	12	31	10	22	3	31	12	16	3
<b>Fenóis voláteis</b>																															
4-etilguaicol	47 (e)	12	1	13	4	12	4	18	6	20	9	18	4	19	5	18	2	17	3	19	6	19	7	18	11	19	5	20	11	19	10
4-etilfenol	440 (e)	51	9	45	10	51	13	72	29	58	19	73	5	72	13	56	13	65	16	77	16	56	20	71	12	70	19	56	9	64	22
<b>Aldéidos</b>																															
Furfural	15 000 (e)	10	10	10	6	7	4	302	171	317	68	157	44	442	87	365	85	242	102	642	223	545	171	565	382	835	204	711	249	563	239
5-hidroximetilfurfural	16 000 (e)	nd		nd		nd		167	130	208	135	93	14	344	169	254	118	138	42	450	245	462	96	402	348	825	312	660	322	442	481
<b>Outros</b>																															
<i>trans,trans</i> -2,4-Hexadien-1-ol	–	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	

nd – Não detetado, em nenhuma das réplicas. (a) (a) – Guth, 1997a; (b) – Moreno *et al.*, 2005; (c) – Ferreira *et al.*, 2000; (d) – Siebert *et al.*, 2005; (e) Boidron *et al.*, 1988.

Os ácidos gordos voláteis que se destacaram por estarem presentes em concentrações acima do seu limiar de percepção foram os ácidos 2-metilbutírico + 3 metilbutírico e o ácido octanóico, que podem dar à sangria odores a ranço, ou mesmo suor (mas que fazem parte do equilíbrio olfativo do vinho/sangria). Os valores das concentrações dos ácidos 2-metilbutírico + 3 metilbutírico não foram muito discrepantes entre as sangrias com os diferentes conservantes. O mesmo não se sucedeu para o ácido octanóico. Esse composto demonstrou estar mais presente na sangria com SP em ambas as temperaturas.

O linalol e o  $\alpha$ -terpeniol, compostos varietais, provêm da uva e/ou da adição de concentrados de frutos. A sua concentração costuma diminuir no tempo de conservação, o que é mais notório para o linalol, que pode nos primeiros estágios, ser convertido a  $\alpha$ -terpeniol (Oliveira *et al.*, 2008). Dos terpenos avaliados, o linalol (aroma floral, a flores de laranjeira, a limão, a laranja, adocicado) foi o composto que se destacou. Parte deste composto, poderá ter vindo do aroma cítrico que é adicionado à sangria. Este composto foi superior na sangria com DMDC em ambas as temperaturas. A 40 °C a sangria com DMDC com 1 mês de envelhecimento (31 d) ainda demonstrou conter esse composto, ao contrário da sangria controlo e da sangria com SP em que o mesmo não foi detetado. A conservação deste composto foi, portanto superior nas sangrias com DMDC.

As concentrações dos ésteres e dos terpenos foram inferiores a 40 °C. Durante o armazenamento, os compostos voláteis do vinho são sujeitos a diferentes reações. No caso dos ésteres podem ocorrer reações de hidrólise/esterificação, cuja velocidade é maior, quanto maior for a temperatura de armazenamento (Scrimgeour *et al.*, 2015). No caso dos terpenos podem ocorrer reações de oxidação.

Os fenóis voláteis e os aldeídos estavam presentes em concentrações abaixo do seu *LPO*. A sangria com SP apresentou menores teores de 4-etilfenol, às demais sangrias avaliadas.

Os dois aldeídos avaliados tiveram teores residuais à  $T_{amb}$  e a 40 °C. Contudo, verificou-se que a 40 °C as concentrações desses compostos foram superiores. Esse aumento é explicado pelo facto destes compostos serem o resultado da degradação do açúcar por caramelização ou reação de *Maillard* a temperaturas elevadas (Es-safi *et al.*, 2000). Nas sangrias com DMDC esses compostos apresentaram concentrações mais baixas. Isto significa que este conservante foi o que retardou mais o envelhecimento das sangrias ao longo dos 4 meses (124 d).

O álcool sórbico (*trans trans* 2,4-hexadien-1-ol), precursor do 2-etoxi-3,5 hexadieno, odor indesejável a gerânio não foi detetado em qualquer sangria. A sua ocorrência poderia acontecer na sangria tratada com ácido sórbico. No entanto, não foi detetada a sua presença pelo método usado.

### 4.2.3 Tempo de Prateleira da Sangria Casal Garcia

Inicialmente era pretendido fazer o cálculo do tempo de prateleira, a partir dos compostos voláteis, mas devido às suas oscilações, causadas pela existência de fermentação nas sangrias controlo e sangrias com sorbato de potássio, não foi possível. Nas sangrias com DMDC, apesar de apenas ter ocorrido fermentação aos 124 d, também ocorreram oscilações nas concentrações dos compostos voláteis, que foram de origem desconhecida.

Depois de avaliar todos os parâmetros físico-químicos da sangria Casal Garcia, neste ensaio de envelhecimento foi selecionado o parâmetro cor, para o cálculo do tempo de prateleira.

O tempo de prateleira foi calculado a partir de  $Q_0$  e de um fator de aceleração (Equações 7, 8 e 9 presentes no subcapítulo 2.2.2.2), que são obtidos a partir da Equação de Arrhenius. Verificou-se que, a variação da coordenada  $b^*$ , ao longo do tempo, correspondia a uma reação de 1.<sup>a</sup> ordem, pois apresentava uma evolução exponencial. Apesar de Palazón *et al.* (2010), terem referido que a variação da coordenada  $b^*$  seguia uma reação de ordem zero, neste trabalho, o ajuste dos dados parece sugerir uma cinética de 1.<sup>a</sup> ordem. O facto de a extensão da evolução do parâmetro, neste caso poder ser diferente entre os dois estudos pode justificar este comportamento (Singh,1994).

A Figura 22 apresenta a evolução da coordenada  $b^*$  nas sangrias tratadas com sorbato de potássio do ensaio de envelhecimento, ao longo dos 124 d a 30 °C e a 40 °C. A  $T_{amb}$ , nessas sangrias, houve um valor de coordenada  $b^*$  discrepante aos 62 d (5,08) e como tal, os dados desse parâmetro, a essa temperatura não foram utilizados para o cálculo do tempo de prateleira.

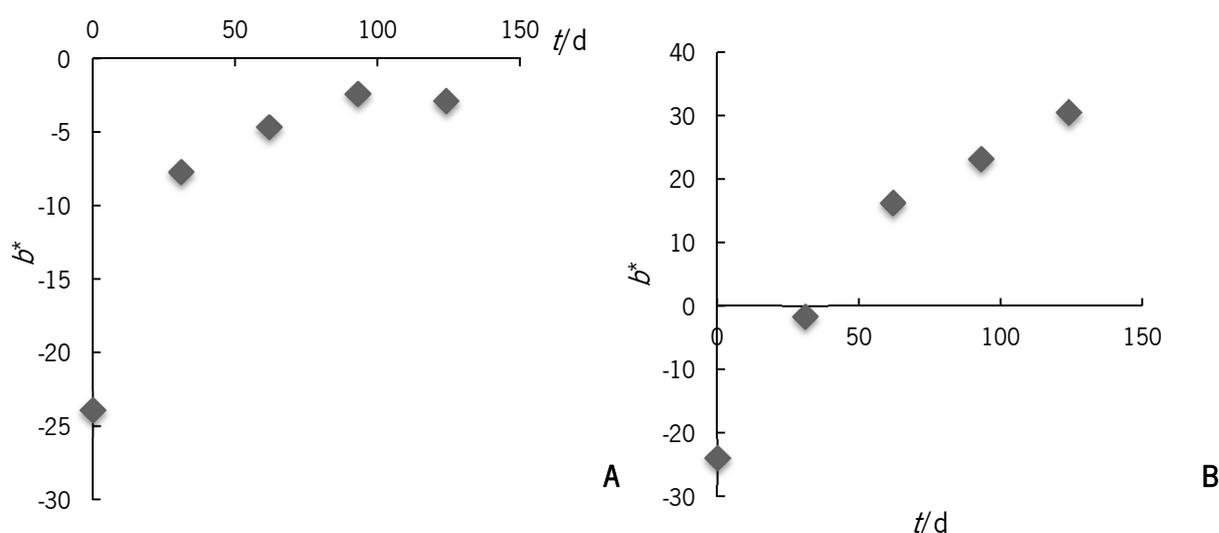


Figura 22 – Evolução da coordenada  $b^*$  das sangrias tratadas com sorbato de potássio, ao longo de 124 d a 30 °C (A) e a 40 °C (B).

Apesar das sangrias dos ensaios de envelhecimento não terem sido sujeitas a uma análise sensorial, a tonalidade amarelada era visível, a olho nu, após 62 d de conservação. Este facto pode ser comprovado pelos valores de  $\Delta E^*$  apresentados no subcapítulo 0. Considerou-se que o parâmetro visual (cor amarelada) não é um parâmetro de qualidade favorável para uma sangria.

Na Tabela 21 estão presentes os resultados das velocidades de reação ( $k$ ) e os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) relativamente à coordenada  $b^*$ , para a temperatura de 30 °C e 40 °C, e o tempo de prateleira ( $t_p$ ) da sangria Casal Garcia obtidos a partir do  $Q_{10}$  e do fator de aceleração para a temperatura de 20 °C.

Tabela 21 – Velocidades de reação ( $k$ ) referentes à coordenada  $b^*$ , a 30 °C e 40 °C, e tempo de prateleira ( $t_p$ ) da sangria Casal Garcia obtido a partir do  $Q_{10}$  e do fator de aceleração ( $FA$ ), a 20 °C

	T/K	Parâmetros de ajuste	$Q_{10}$	$t_p^{(20)}$	$E_a/$ (kJ/mol)	FA	$t_p^{(FA)}$
Coordenada $b^*$	303,15	$k/d^1$	0,0175	4,94	126,03	27,18	28 meses
		$R^2$	0,858				
	313,15	$k/d^1$	0,0864	10 meses			
		$R^2$	1*				

\*Foram utilizados apenas 2 dados, pois a coordenada  $b^*$  aos 62 d já era positiva.

Para o cálculo do tempo de prateleira ( $t_p$ ) foi tido em conta o último tempo em que a coordenada  $b^*$  era negativa (indicação de cor azul), pois, a partir daí, os tons amarelados já eram notórios. A 30 °C (303,15 K), as sangrias apresentaram valores negativos sempre, *i.e.*, até aos 124 d. Após 62 d, a 40 °C (313,15 K), a coordenada  $b^*$  já apresentava valores positivos. Sabendo que, aos 31 d a 40 °C a cor da sangria ainda não apresenta tons amarelos, determinou-se o tempo de prateleira para 20 °C, multiplicando este tempo pelo fator de aceleração ( $FA$ ) calculado, obtendo-se um valor de 28 meses. A partir de  $Q_{10}$  obteve-se um tempo de prateleira de 10 meses. Este valor foi obtido multiplicando  $Q_{10}$  por 2 e por 31 d, para extrapolar o tempo de prateleira para 20 °C. A  $E_a$  obtida por Palazón *et al.* (2010) para a coordenada  $b^*$  para um produto à base de maçã foi de 15,6 kcal/mol. Além de serem produtos diferentes, o valor de  $E_a$  deste trabalho foi superior, porque se obteve uma coordenada  $b^*$  mais elevada em menor tempo.

Ambos os tempos de prateleira foram calculados a partir de um ensaio de envelhecimento acelerado e, tendo em conta apenas o parâmetro cor. No subcapítulo 4.3 são apresentados os resultados de um controlo de qualidade de diferentes lotes de sangria, tendo como base um estudo de armazenamento à escala real.

#### 4.2.4 Parâmetros microbiológicos

Para a verificação da qualidade dos alimentos, a avaliação microbiológica é de extrema relevância, pois fornece informações quanto às condições de processamento, armazenamento, distribuição, vida útil e risco à saúde da população (Franco e Landgraf, 2004).

A deterioração microbiana do vinho pode ter um grande impacto sobre a sua qualidade. As técnicas microbiológicas tradicionais têm sido usadas, ao longo de décadas, para ajudar na identificação e quantificação de microrganismos de vinho na adega. Estas incluem, o plaqueamento direto e a microscopia (Osborne, 2010).

Neste sentido, foram realizadas análises microbiológicas aos ingredientes utilizados para a produção das sangrias do ensaio do envelhecimento e às sangrias Casal Garcia do ensaio de envelhecimento com diferentes conservantes, de forma a verificar o seu espectro de ação microbiano. Estas análises microbiológicas foram efetuadas como forma de controlo de microrganismos deteriorantes da qualidade, pois no vinho, que é o principal componente da sangria não existem microrganismos patogénicos (Osborne, 2010).

##### 4.2.4.1 Ingredientes das sangrias de envelhecimento

Antes de realizar o ensaio de envelhecimento de sangria com diferentes conservantes foi realizado um controlo microbiológico da mistura de vinho rosado e tinto, da água usada para baixar *TAV* e do mosto concentrado retificado (MCR), utilizado como edulcorante na produção de sangria. Os resultados encontram-se plasmados na Tabela 22.

Tabela 22 – Resultados das análises microbiológicas, de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, aos ingredientes utilizados na formulação da sangria para o ensaio de envelhecimento

Amostra	Meio de cultura	Microrganismo	Método	Resultado <i>UFC/mL</i> <sup>-1</sup>
Mistura de Vinho Rosado e Tinto	PCA	Microrganismos Totais		$1,43 \times 10^3$
	WL	Leveduras	Diluições decimais sucessivas	$> 3,0 \times 10^2$
	<i>Acetobacter</i> agar	<i>Acetobacter</i> spp.		$0,3 \times 10$
	MRS agar	Bactérias Lácticas		$> 3,0 \times 10^2$
	<i>Brett Allert</i>	<i>Brettanomyces</i> spp.	Pesquisa	Ausência
Água	PCA	Microrganismos Totais	Membrana filtrante 0,22 $\mu\text{m}$ e 0,45 $\mu\text{m}$	$> 3,0 \times 10^2$
			Diluições decimais sucessivas	$1,36 \times 10^4$
MCR	PCA	Microrganismos Totais	Diluições decimais sucessivas	$1,6 \times 10$
	WL	Leveduras		$1,6 \times 10^2$

Em relação à mistura dos dois vinhos, como ainda não tinha sido efetuada qualquer filtração tangencial, os valores obtidos para as concentrações de microrganismos totais, leveduras e bactérias lácticas foram os esperados.

Segundo Adams e Moss (2008), a contagem total de mesófilos (microrganismos totais) é utilizada como uma indicação geral da qualidade microbiológica, embora não seja adequada para a análise de alimentos fermentados, como é o caso do vinho, que contém um grande número de microrganismos como consequência natural da sua preparação. No entanto, este tipo de análise foi realizada para ter uma ideia da carga microbiana dos ingredientes da sangria.

A levedura *Brettanomyces*, que poderia causar problemas, encontrava-se ausente, sendo este resultado obtido através do método de deteção do aroma de odor a “cavalo” num frasco com meio de *Brett Allert* e da presença de gás ao abrir o frasco de meio de cultura líquido. Relativamente à água utilizada na produção da sangria para baixar o *TAV*, o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto, impõe que o número máximo de colónias contadas, a 22 °C, seja de 100/mL<sup>-1</sup>. A 37 °C, o mesmo Decreto-Lei impõe a concentração máxima de colónias contadas seja de 20/mL<sup>-1</sup>. À temperatura utilizada no ensaio, 30 °C, a concentração excede os valores legais, tanto no método por filtração de cerca de 250 mL, como no de diluições sucessivas.

Por fim, em relação à qualidade microbiológica do ingrediente MCR, nada se pode concluir devido à falta de critérios de aceitabilidade acessíveis. No entanto, os valores de *UFC*, no caso das leveduras foram relativamente baixos ( $1,6 \times 10^2$  mL<sup>-1</sup>).

#### 4.2.4.2 Sangrias dos ensaios de envelhecimento

De forma a verificar o espectro de ação de diferentes conservantes na sangria Casal Garcia foram efetuadas análises microbiológicas de diferentes indicadores. Os resultados dessas análises encontram-se na Tabela 23.

É importante referir que estas análises foram efetuadas às sangrias que estiveram a 20 °C, porque as temperaturas 30 °C e 40 °C não correspondem à realidade a que o produto iria estar sujeito, na maioria do tempo.

Apesar de não haver critérios de aceitabilidade para o produto sangria, verifica-se que o conservante DMDC foi o que possuiu superior espectro de ação, em todos os indicadores avaliados.

Tabela 23 – Resultados das análises microbiológicas, de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, a sangrias com diferentes conservantes, ao longo dos 124 d de envelhecimento

Amostragem	Amostra de Sangria	Meio de cultura	Microrganismo	Método	Resultado <i>UFC/mL</i> <sup>-1</sup>
15 d	Controlo	PCA	Microrganismos Totais		$4,25 \times 10^4$
		<i>Acetobacter</i> agar	<i>Acetobacter</i> spp.		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$> 3,0 \times 10^2$
	DMDC	PCA	Microrganismos Totais		$< 1,0 \times 10$
		<i>Acetobacter</i> agar	<i>Acetobacter</i> spp.		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$< 1,0 \times 10$
	BP	PCA	Microrganismos Totais	Diluições decimais sucessivas com centrifugação	$< 1,0 \times 10$
		<i>Acetobacter</i> agar	<i>Acetobacter</i> spp.		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$0,7 \times 10$
	BS	PCA	Microrganismos Totais		$< 1,0 \times 10$
		<i>Acetobacter</i> agar	<i>Acetobacter</i> spp.		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$0,1 \times 10$
	SP	PCA	Microrganismos Totais		$> 3,0 \times 10^2$
		<i>Acetobacter</i> agar	<i>Acetobacter</i> spp.		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$> 3,0 \times 10^2$
31 d	Controlo	PCA	Microrganismos Totais		$> 3,0 \times 10^2$
		<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$> 3,0 \times 10^2$
		<i>Acetobacter</i> agar	<i>Acetobacter</i> spp.		$< 1,0 \times 10$
	DMDC	MRS agar	Bactérias Lácticas		$> 3,0 \times 10^2$
		PCA	Microrganismos Totais		$< 1,0 \times 10$
		<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$< 1,0 \times 10$
	BP	<i>Acetobacter</i> agar	<i>Acetobacter</i> spp.	Diluições decimais sucessivas com centrifugação	$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$0,7 \times 10$
		PCA	Microrganismos Totais		$> 3,0 \times 10^2$
	BS	<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$< 1,0 \times 10$
		<i>Acetobacter</i> agar	<i>Acetobacter</i> spp.		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$< 1,0 \times 10$
	SP	PCA	Microrganismos Totais		$> 3,0 \times 10^2$
		<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$> 3,0 \times 10^2$
		<i>Acetobacter</i> agar	<i>Acetobacter</i> spp.		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$< 1,0 \times 10$

124 d	Controlo	<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$> 3,0 \times 10^2$
		<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$> 3,0 \times 10^2$
	DMDC	<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$> 3,0 \times 10^2$
		<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		$0,1 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$0,2 \times 10$
	BP	<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras	Diluições decimais sucessivas sem centrifugação	$> 3,0 \times 10^2$
		<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$> 3,0 \times 10^2$
	BS	<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$> 3,0 \times 10^2$
		<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$< 1,0 \times 10$
	SP	<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$> 3,0 \times 10^2$
		<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		$< 1,0 \times 10$
		MRS agar	Bactérias Lácticas		$> 3,0 \times 10^2$
	Todas as sangrias	<i>Brett Allert</i>	<i>Brettanomyces</i> spp.	Pesquisa	Ausência

Na última análise, apesar da concentração de leveduras ter sido elevado na sangria com DMDC, aquando da execução da análise, não se verificou a presença de gás, indicativa de existência de fermentação. Pela indicação da concentração de leveduras, ocorreu fermentação nas sangrias tratadas com os restantes conservantes. Este facto é explicado pela ausência de filtração de sangria (em membrana de  $0,45 \mu\text{m}$ ), pois a sua recolha para estudo foi efetuada na rede de frio, isto é, antes da filtração e engarrafamento. No que se refere às bactérias acéticas o número de colónias identificadas foi residual para todas as sangrias em estudo. Relativamente às bactérias lácticas, a sua inibição foi mais notória na sangria com DMDC em todas as amostragens e na sangria com benzoato de sódio apenas na última análise.

#### 4.2.4.3 Sangrias tratadas com benzoato de potássio e com benzoato de sódio

Para as sangrias tratadas com benzoato de potássio e com benzoato sódio foram efetuadas análises microbiológicas complementares (Tabela 24) em relação às sangrias com outros conservantes, pois este foi o único parâmetro utilizado para verificar a sua qualidade.

Segundo Jackson (2008), o ácido benzóico e o benzoato de sódio foram uma vez aplicados em vinhos para inibir o crescimento de leveduras, mas a sua ineficácia geral e a modificação do sabor fizeram com que a sua utilização fosse suprimida.

Tabela 24 – Resultados das análises microbiológicas, de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, a sangrias tratadas com benzoato de potássio e com benzoato de sódio (análises adicionais)

Amostragem	Amostra de Sangria	Meio de cultura	Microrganismo	Método	Resultado <i>UFC/mL</i> <sup>-1</sup>
62 d	BP	PCA	Microrganismos Totais		$9,0 \times 10$
		<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$1,3 \times 10^2$
		<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		$0,1 \times 10$
		<i>WL Differential agar</i>	Bactérias Lácticas	Diluições decimais	$< 1,0 \times 10$
	BS	PCA	Microrganismos Totais	sucessivas sem centrifugação	$< 1,0 \times 10$
		<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$0,1 \times 10$
		<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		$< 1,0 \times 10$
		<i>WL Differential Agar</i>	Bactérias Lácticas		$0,1 \times 10$
93 d	BP	PCA	Microrganismos Totais		$> 3,0 \times 10^2$
		<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$1,6 \times 10^2$
		<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		$0,2 \times 10$
		<i>WL Differential Agar</i>	Bactérias Lácticas	Diluições decimais sucessivas sem centrifugação	$< 1,0 \times 10$
	BS	PCA	Microrganismos Totais		$< 1,0 \times 10$
		<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		$< 1,0 \times 10$
		<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		$0,1 \times 10$
		<i>WL Differential Agar</i>	Bactérias Lácticas		$> 3,0 \times 10^2$
BP BS	<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras	Filtração Esterilizante 0,22 $\mu\text{m}$ (250 mL)	$> 3,0 \times 10^2$	

A ineficácia dos conservantes benzoato de sódio e potássio foi evidenciada pelos resultados obtidos no método de filtração esterilizante, pois as sangrias apresentaram uma carga microbiana elevada. No entanto, embora os benzoatos sejam utilizados para inibirem as leveduras, por funcionarem preferencialmente num pH mais baixo (Somogyi, 2006), o benzoato de potássio demonstrou possuir um efeito inibitório do crescimento de bactérias lácticas, ao contrário do benzoato de sódio.

#### 4.2.4.4 Identificação de microrganismos

Tal como foi referido no Capítulo 3, pertencente aos materiais e métodos, utilizou-se a coloração de gram para identificação de bactérias gram-positivas e gram-negativas e de leveduras. Além disso, também se recorreu ao teste da catalase de forma a distinguir as bactérias lácticas das acéticas.

Na Figura 23 encontram-se imagens microscópicas dos microrganismos identificados, nomeadamente, leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas.

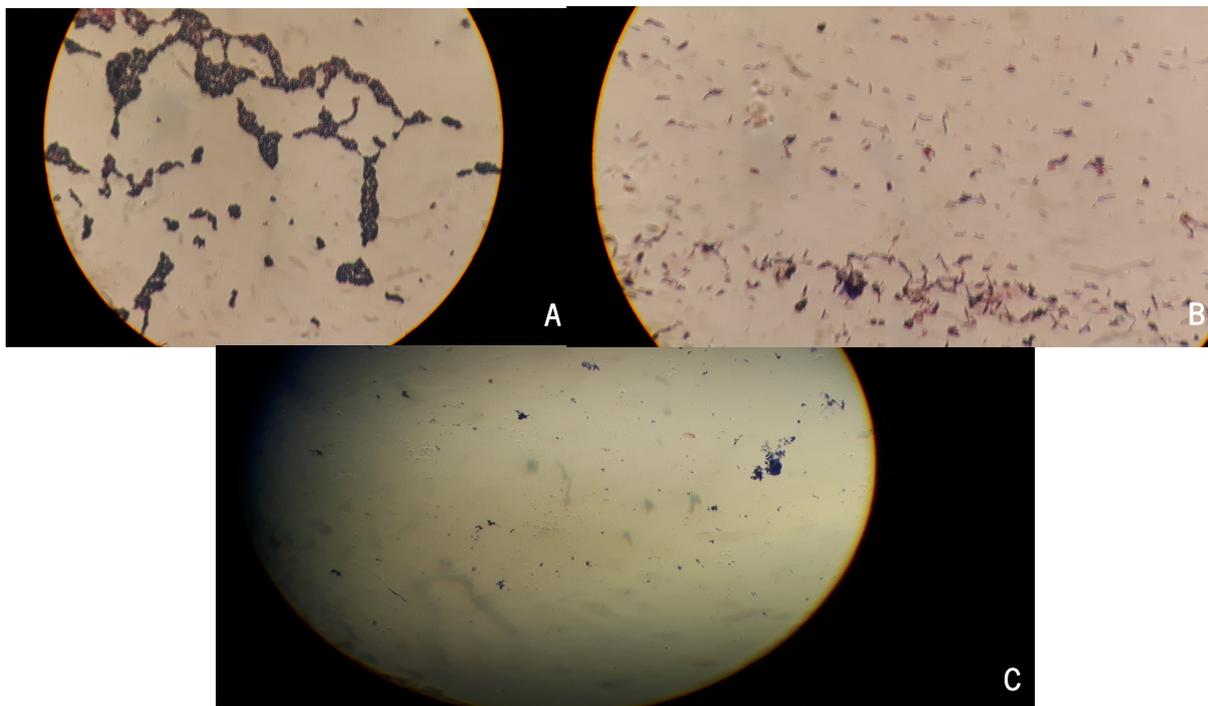


Figura 23 – Imagens microscópicas (x1000) de leveduras (A), bactérias acéticas (B) e bactérias lácticas (C).

As bactérias que retêm a cor violeta conferida pelo primeiro corante (cristal de violeta) são gram-positivas (Figura 23 C). Nas bactérias gram-negativas a permanência do corante no interior da célula não acontece, pois, descoram com a ação do álcool. Para poderem ser visualizadas, é necessário adicionar um outro corante, a safranina para que retenha a cor vermelha (Figura 23 B). Este acontecimento de perda de cor é explicado pela composição da parede celular de ambos os tipos de bactérias. As bactérias gram-positivas apresentam uma espessa camada de peptidoglicanos e, por outro lado, as gram-negativas possuem uma parede celular mais complexa, constituída por uma fina camada de peptidoglicanos que é revestida externamente por uma estrutura semelhante à membrana plasmática, constituída por lipopolissacarídeos, fosfolípidos, proteínas e lipoproteínas (Pardo *et al.*, 2015).

A Figura 24 apresenta imagens do teste da catalase efetuado em lâmina.

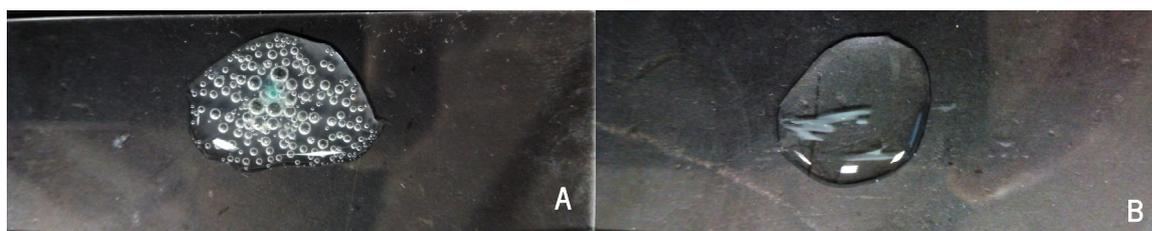


Figura 24 – Testes da presença de catalase para auxílio de identificação de bactérias acéticas – catalase positivo (A) e de bactérias lácticas – catalase negativo (B).

O peróxido de hidrogénio e outras espécies de oxigénio reativas são produzidos na redução do oxigénio durante a respiração celular. As espécies de oxigénio ao reagirem com as células, fazem com que a célula produza enzimas específicas como a catalase e a superóxido dismutase, uma vez que essas espécies são tóxicas para a célula (Madigan *et al.*, 2009). A catalase, enzima que destrói o peróxido de hidrogénio, dando origem a oxigénio e água, está presente na maioria dos seres vivos, entre os quais bactérias aeróbias e aeróbias facultativas. Esta pesquisa é rápida, simples e permite a distinção de bactérias lácticas (catalase-negativo) das bactérias acéticas (catalase-positivo) (Pardo *et al.*, 2015).

As bactérias acéticas são catalase-positivo (presença de bolhas de ar – Figura 24 A) e as bactérias lácticas são catalase negativo (ausência de bolhas de ar – Figura 24 B) porque são anaeróbios aerotolerantes e são incapazes de realizar a respiração aeróbica. No entanto, podem crescer na presença de oxigénio, porque apesar de não possuírem a catalase, nem a superóxido dismutase, possuem um mecanismo para a destruição de superóxidos com base na acumulação de concentrações milimolares de manganês (Adams e Moss, 2008).

Estas imagens das técnicas de identificação de microrganismos também pertencem ao subcapítulo 4.3.2, correspondente às análises microbiológicas dos lotes de sangria Casal Garcia.

### 4.3 Controlo de Qualidade de Lotes de Sangria Casal Garcia

#### 4.3.1 Parâmetros Físico-químicos

Para efeitos de controlo de qualidade físico-química de 4 lotes de sangria, foram realizadas análises físico-químicas, nomeadamente aos parâmetros dióxido de enxofre livre e total, acidez volátil e total, pH, título alcoométrico volúmico adquirido (*TAI*), substâncias reductoras e coordenadas CIELab (Tabela 25). Uma vez que as sangrias são diferentes, pois não foram elaboradas com o mesmo vinho base, não foi aplicado qualquer teste estatístico aos resultados.

O que se pode ver pela Tabela 25 é que, apesar de haver diferença de sensivelmente um ano entre as sangrias e os lotes serem diferentes (as sangrias não possuem o mesmo vinho), a coordenada  $b^*$  (azul/amarelo) ainda possui valores negativos em todos os lotes, o que indica pouco envelhecimento. É importante referir que os lotes são diferentes, e portanto o vinho que constitui a sangria evolui de diferentes maneiras, não se podendo afirmar que os lotes de 2016 irão evoluir da mesma forma que os de 2015.

Tabela 25 – Resultados das análises físico-químicas realizadas aos 4 lotes de sangria distintos de diferentes tempos de armazenamento. Para cada parâmetro é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança

Parâmetros Físico-Químicos	Lote 396 d	±	Lote 356 d	±	Lote 62 d	±	Lote 31 d	±
$C_{SO_2 \text{ livre}} / (\text{mg/L})$	28,33	6,25	26,67	2,87	31,67	2,87	42,00	8,60
$C_{SO_2 \text{ total}} / (\text{mg/L})$	81,00	4,30	95,00	0,00	105,33	11,47	136,33	7,17
$AV / (\text{g/L})$	0,41	0,03	0,45	0,12	0,41	0,18	0,44	0,11
$AT / (\text{g/L})$	4,49	0,09	4,52	0,5	3,96	0,07	4,85	0,09
pH	3,42	0,08	3,44	0,07	3,44	0,03	3,44	0,04
$TAV / \%$	7,98	0,05	7,82	0,02	8,04	0,04	8,18	0,03
$SR / (\text{g/L})$	94,12	3,32	87,00	1,67	109,34	3,99	97,91	1,50
$L^*$	35,65	2,03	35,85	3,33	44,57	2,51	47,31	0,36
$a^*$	60,05	2,66	54,38	3,43	56,94	2,64	58,18	0,82
$b^*$	-34,84	5,14	-27,76	2,81	-43,83	4,76	-46,04	0,97
$C^*$	69,43	4,87	61,06	4,30	71,86	4,82	74,19	1,22
$H^*$	-0,53	0,04	-0,47	0,02	-0,66	0,04	-0,67	0,00

Na leitura das coordenadas de cor das sangrias Casal Garcia do ensaio de envelhecimento, verificou-se que a 20 °C, para 124 d, a coordenada  $b^*$  apresentou valores positivos, o que indica tons mais amarelados. Isto, significa que, o ensaio de envelhecimento não correspondeu à realidade, apesar da base vínica não ser a mesma, pois a sangria com 396 d ainda não possuía valores positivos da coordenada  $b^*$ . Apesar da base vínica das sangrias do ensaio de envelhecimento não ser a mesma que a dos lotes avaliados, o tempo de prateleira de 10 meses obtido a partir de  $Q_{10}$ , parece não responder à realidade, tendo em conta apenas este parâmetro de qualidade. Pela indicação dos valores da coordenada  $b^*$  dos lotes, o tempo de prateleira da sangria Casal Garcia será mais de um ano. O valor de 28 meses previsto pelo fator de aceleração no ensaio de envelhecimento terá de ser comprovado através de mais análises complementares sensoriais periódicas, e eventualmente microbiológicas, como por exemplo, após 1 ano e 6 meses, 2 anos e 2 anos e 4 meses.

Em relação aos restantes parâmetros, não se verificou qualquer alteração com impacto na qualidade da sangria, à exceção dos valores de  $SO_2$  livre e total que, como era esperado, são mais baixos para sangrias com maior tempo de conservação. Apesar da concentração das substâncias redutoras ser menor nos lotes de 2015, esse fato apenas se deveu à formulação elaborada na altura da sua produção. Não se verificou a existência de fermentação alcoólica, pois não ocorreu aumento de  $TAV$ , relativamente aos 8 % (valor pretendido de  $TAV$  da sangria Casal Garcia). O objetivo na formulação de sangria Casal Garcia é atingir os 100 g de açúcar.

Além da quantificação de  $SO_2$  livre efetuada após 396 d (lote de abril de 2015) e após 356 d (lote de maio de 2015), realizou-se uma comparação com dados de  $SO_2$  livre obtidos aquando do

engarraamento, presentes no registo de lotes da Aveleda (Tabela 26). Os dados de SO<sub>2</sub> livre foram submetidos a um teste de variância, Anova de medidas repetidas.

Tabela 26 – Resultados da concentração de SO<sub>2</sub> livre ( $C_{SO_2 \text{ livre}}$ ) de dois lotes de sangria no momento do engarraamento e 396 d e 356 d depois. Para cada composto é indicado o valor médio de 3 garrafas e o erro associado a 95 % de confiança

Lote 396 d				Lote 356 d			
Engarraamento		396 d após		Engarraamento		356 d após	
$C_{SO_2 \text{ livre}} / (\text{mg/L})$	$\pm$						
41,67 <sup>a</sup>	1,43	28,33 <sup>b</sup>	6,25	64,00 <sup>a</sup>	4,30	26,67 <sup>b</sup>	2,87

letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

O dióxido de enxofre é o aditivo mais comum utilizado para a preservação do vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Esse composto tem tendência a diminuir ao longo do tempo e a sua atividade antioxidante, eventualmente, torna-se insuficiente para evitar a oxidação e, por isso, a concentração aparente de SO<sub>2</sub> livre é, muitas vezes, usada como um indicador para o tempo de prateleira (Scrimgeour *et al.*, 2015).

No engarraamento é aconselhável adicionar ao vinho uma concentração de SO<sub>2</sub> molecular livre entre 0,8 mg/L e 1,5 mg/L, de forma a limitar a oxidação e a deterioração microbiana (Jackson, 2008). Como foi possível verificar pela Tabela 25, as sangrias possuem um pH médio igual a 3,44 e a esse pH, apenas como SO<sub>2</sub> molecular está disponível 2,5 %. Para atingir 0,8 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular seriam aconselháveis, no mínimo 32 mg/L de SO<sub>2</sub> livre. O intervalo referido acima, 0,8 mg/L a 1,5 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular, têm sido geralmente considerado como suficiente para inibir o crescimento da maioria de leveduras e bactérias deteriorantes em vinhos doces (mais parecido com o produto sangria).

Como não ocorreu fermentação no lote com 356 d, o que foi possível verificar pelos valores de  $AV$ , de  $TAV$  e de  $SR$ , os valores de 28,33 mg/L e 26,67 mg/L de SO<sub>2</sub> livre obtidos, para o lote com 396 d e 356 d, respetivamente, foram suficientes para o controlo microbiano. Portanto, se a sangria for produzida nas mesmas condições (importante  $C_{SO_2 \text{ livre}}$  inicial), poderá manter-se estável durante o período de 1 ano. É importante ter em conta que, como a sangria possui muito açúcar, o SO<sub>2</sub> combina-se, diminuindo a sua disponibilidade, daí ser relevante a medição do SO<sub>2</sub> livre antes do engarraamento. Além do SO<sub>2</sub> esta sangria contém outro conservante, o sorbato de potássio, que auxilia ainda mais na estabilidade microbiana, principalmente na inibição do desenvolvimento de leveduras. Por isso, mesmo que o SO<sub>2</sub> esteja abaixo do valor crítico é necessário considerar a ação desse conservante.

#### 4.3.2 Parâmetros Microbiológicos

Neste subcapítulo são apresentados os resultados das análises microbiológicas, aos lotes de sangria Casal Garcia com 396 d e 356 d e a sangrias produzidas no laboratório da Aveleda, nomeadamente a

uma sangria de um ensaio com 582 d (agosto de 2014) e de sangria da formulação Casal Garcia filtrada a 0,22 µm e 0,45 µm com a adição de sorbato de potássio.

#### 4.3.2.1 Sangria tratada com sorbato de potássio filtrada em membranas de 0,22 µm e 0,45 µm

Para efeitos de comparação de barreira microbiológica de membranas de 0,22 µm e de 0,45 µm na filtração de sangria, foram realizadas análises microbiológicas (Tabela 27) de sangria Casal Garcia produzida, engarrafada e filtrada no laboratório da Aveleda, SA.

Tabela 27 – Resultados das análises microbiológicas de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, a sangrias com sorbato de potássio produzidas e filtradas a 0,22 µm e 0,45 µm em laboratório

Amostra de Sangria	Meio de cultura	Microrganismo	Método	Resultado <i>UFC</i> /mL <sup>-1</sup>
SP filtrada a 0,22 µm	PCA	Microrganismos Totais	Diluições decimais sucessivas sem centrifugação	< 1,0 × 10
	<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		< 1,0 × 10
	<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		0,2 × 10
	MRS agar	Bactérias Lácticas		<1,0 × 10
	<i>Sniff Brett</i>	<i>Brettanomyces</i> spp.	Pesquisa	Ausência
SP filtrada a 0,45 µm	PCA	Microrganismos Totais	Diluições decimais sucessivas sem centrifugação	<1,0 × 10
	<i>WL Nutrient Agar</i>	Leveduras		<1,0 × 10
	<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		<1,0 × 10
	MRS agar	Bactérias Lácticas		<1,0 × 10
	<i>Sniff Brett</i>	<i>Brettanomyces</i> spp.	Pesquisa	Ausência

Dos resultados da Tabela 27 constatou-se que, depois de sensivelmente 3 meses da sangria ter sido engarrafada, ambas as membranas funcionaram bem em termos de barreira a microrganismos para todos os indicadores avaliados. No caso de bactérias acéticas, a sangria filtrada a 0,22 µm, apresentou uma concentração (como *UFC*) residual (0,2 × 10 /mL<sup>-1</sup>).

#### 4.3.2.2 Sangria com 582 d

De forma a verificar a carga microbiana de uma sangria com 582 d de um ensaio que foi elaborado na Aveleda para efeitos de otimização de formulação e definição do tempo de prateleira, foram efetuadas análises microbiológicas, cujos resultados se encontram na Tabela 28.

Tabela 28 – Resultados das análises microbiológicas de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, a uma sangria com 582 d

Amostra	Meio de cultura	Microrganismo	Método	Resultado <i>UFC</i> /mL <sup>-1</sup>
Sangria com 582 d	PCA	Microrganismos Totais	Diluições decimais sucessivas sem centrifugação	1,92 × 10 <sup>2</sup>
	<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas		< 1,0 × 10
	MRS agar	Bactérias Lácticas		3,27 × 10
	<i>Sniff Brett</i>	<i>Brettanomyces</i> spp.	Pesquisa	Ausência

A partir da Tabela 28 é possível verificar que, apesar de serem desconhecidos critérios de aceitabilidade de qualidade microbiológica de sangria nestes indicadores, a sangria com 582 d de armazenamento apresentou concentrações baixas de bactérias láticas. Quanto maior for a presença de bactérias láticas, maior poderá ser a produção do composto responsável pelo odor a gerânio, 2-etoxi-3,5-hexadieno. Mesmo sabendo que as bactérias láticas podem produzir esse composto, o resultado obtido pode ter sido, devido ao facto da sangria ter sido produzida em laboratório, cujas condições de esterilização não são as mesmas que a nível industrial.

#### 4.3.2.3 Lotes com 396 d e 356 d

Para efeitos de auxílio na determinação do tempo de prateleira de sangrias foram efetuadas análises microbiológicas de lotes de sangria Casal Garcia com 396 d e 356 d em garrafa. Os resultados do controlo realizado a nível microbiológico encontram-se na Tabela 29.

Tabela 29 – Resultados das análises microbiológicas de diferentes indicadores efetuadas, em duplicado, a lotes de sangria engarrafadas com cerca de 1 ano

Lotes de Sangria	Meio de cultura	Microorganismo	Método	Resultado <i>UFC</i> /mL <sup>-1</sup>
396 d	PCA	Microrganismos Totais		<1,0 × 10
	<i>WL Nutrient</i> Agar	Leveduras	Diluições decimais sucessivas	<1,0 × 10
	<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas	sem centrifugação	<1,0 × 10
	MRS agar	Bactérias Látricas	Filtração esterilizante 0,22 µm	<1,0 × 10
	<i>Sniff Brett</i>	<i>Brettanomyces</i> spp.	Pesquisa	Ausente
356 d	PCA	Microrganismos Totais		<1,0 × 10
	<i>WL Nutrient</i> Agar	Leveduras	Diluições decimais sucessivas	<1,0 × 10
	<i>GYC</i>	Bactérias Acéticas	sem centrifugação	<1,0 × 10
	MRS agar	Bactérias Látricas	Filtração esterilizante 0,22 µm	1,1 × 10
	<i>Sniff Brett</i>	<i>Brettanomyces</i> spp.	Pesquisa	<1,0 × 10

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas de lotes de sangria com mais de um ano foram satisfatórios. No caso da sangria com 356 d, a concentração celular de bactérias látricas, como *UFC*, foi em média 1,1×10 mL<sup>-1</sup>. Portanto, além do SO<sub>2</sub> adicionado, verificou-se que o conservante sorbato de potássio, utilizado na formulação de sangria demonstrou garantir a estabilidade do produto em termos microbiológicos. Pelo menos, se a sangria for produzida nas mesmas condições, através destes resultados foi possível averiguar a garantia de estabilidade microbiológica da sangria no período de um ano.

### 4.3.3 Caraterização sensorial

#### 4.3.3.1 Prova Descritiva

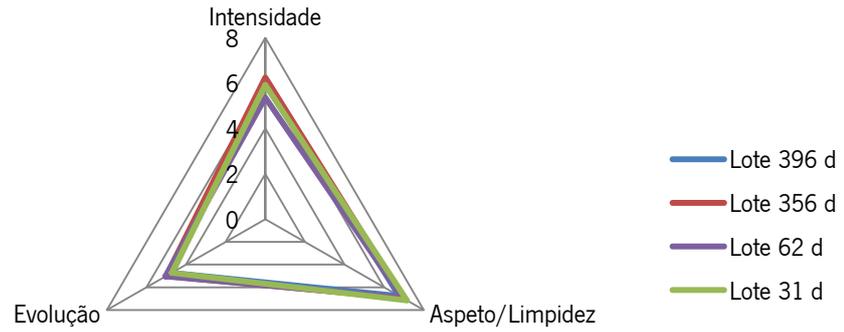
Foi realizada uma análise sensorial descritiva a 4 lotes de sangria Casal Garcia com diferentes tempos de armazenamento, com 396 d, com 356 d, com 62 d e com 31 d, de forma a caraterizá-los em termos de qualidade sensorial e, para verificar se apenas os lotes mais recentes eram os prediletos. Na Figura 25 estão presentes os resultados da prova descritiva em relação aos parâmetros cor, aroma e sabor dos 4 lotes de sangria Casal Garcia.

Os resultados desta prova não são fundamentados com um teste estatístico, porque os provadores não utilizaram a escala (1 a 9) da mesma forma. No entanto, através da Figura 25 foi possível verificar que, as sangrias avaliadas aparentam ser bastante similares, apesar do tempo de armazenamento ser distinto, assim como a sua composição vínica. Foi, portanto, notório que existe coerência, em termos de atributos sensoriais, nos lotes de sangria Casal Garcia produzidos na Aveleda.

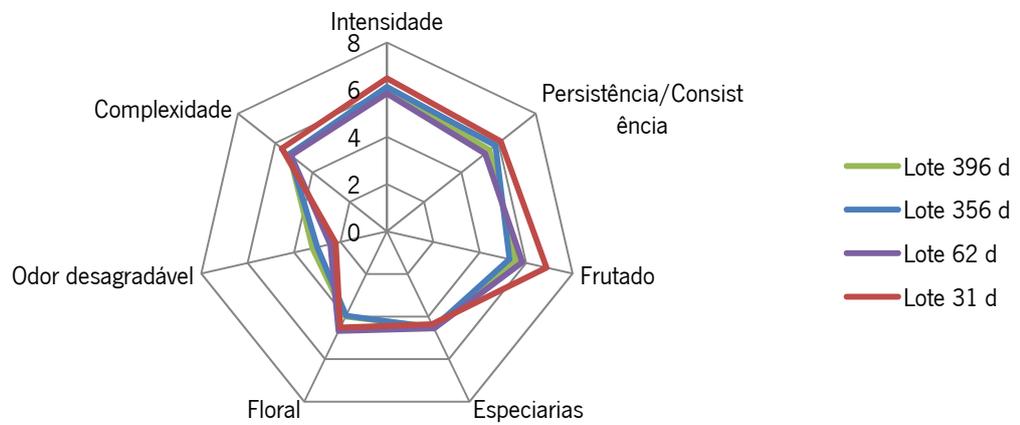
Apesar de não haver um fundamento estatístico, foi verificado que os lotes com mais tempo de armazenamento, isto é, com 396 d e com 356 d, possuem, segundo os provadores, maior intensidade de cor, com valores de 6,12 e 6,24, respetivamente. Neste caso, os provadores referiram que as sangrias mais antigas eram mais escuras, que as mais recentes. O aspeto e a limpidez dos lotes das sangrias foram idênticos. Em relação à evolução de cor, o lote com 396 d e o lote com 31 d, ou seja, o lote com maior e o lote menor tempo de armazenamento, obtiveram a mesma pontuação nesse atributo (4,72), o que significa que no lote de sangria mais recente foi utilizado um vinho que era mais envelhecido. Pelo valor atribuído pelos provadores à evolução de cor, esta foi considerada moderada.

Na componente aromática, o lote com 31 d foi o que obteve melhores resultados, o que já era esperado, por ser o mais recente. Nos descritores intensidade, persistência, frutado, e complexidade, esse lote teve uma pontuação média de 6,48; 6,12; 6,88; e 5,64, respetivamente. Portanto, segundo os provadores, a intensidade do aroma e o aroma frutado foram considerados fortes e a persistência do aroma e a sua complexidade foram considerados ligeiramente fortes. Relativamente ao descritor especiarias, entre os lotes avaliados, não existiu nenhum que se destacasse. A média nesse descritor andou à volta de 4,50, o que significa que os provadores acharam que esse atributo foi moderado. Para os provadores, o aroma floral foi superior nos lotes de 62 d e 31 d de armazenamento e foi considerado moderado, tendo de pontuação média o valor de 4,68 e 4,52, respetivamente. Segundo os provadores, o odor desagradável foi extremamente fraco e fraco em todos os lotes, o que foi indicado por pontuações médias entre 2,40 e 3,20. Este último valor correspondeu ao lote com 396 d.

## Cor



## Aroma



## Sabor

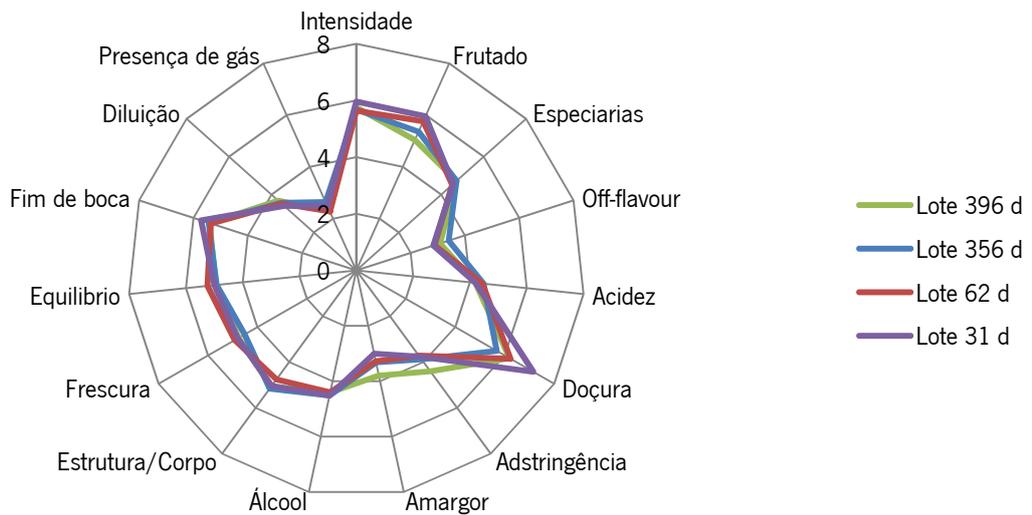


Figura 25 – Pontuação média calculada de (1 a 9) atribuída pelos provadores, para os descritores avaliados nos parâmetros cor, aroma e sabor de lotes de sangria Casal Garcia, com diferentes tempos de armazenamento (396 d, 356 d, 62 d e 31 d).

Na componente aromática foi ainda solicitado aos provadores que seleccionassem os aromas que conseguissem detetar nos 4 lotes. Uma análise categórica de componentes principais (CATPCA) foi aplicada e permitiu extrair duas componentes que representam 90,3 % da variância total inicial.

A representação gráfica das duas primeiras componentes principais (Figura 26) permite verificar que os lotes não se encontram agrupados por tempo de armazenamento. A primeira componente (53,00 % da variância) permite separar o lote de 31 d, dos lotes de 62 d e de 356 d, enquanto que a componente 2 (37,25 %) separa o lote de 396 d dos restantes lotes.

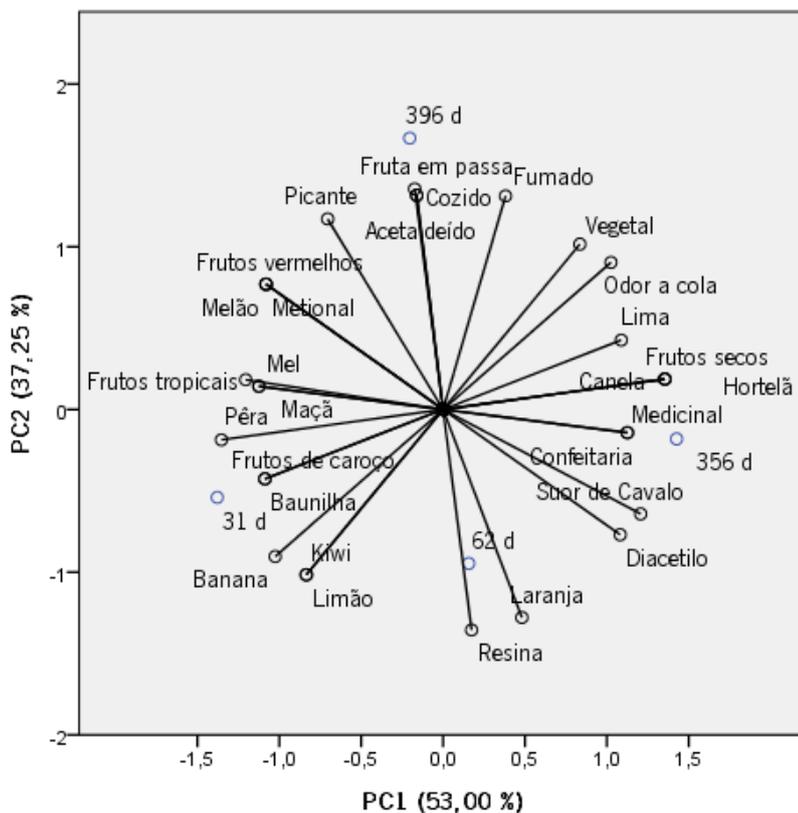


Figura 26 – Representação gráfica das duas primeiras componentes principais para os aromas selecionados na prova descritiva dos 4 lotes de sangria Casal Garcia com 396 d, 356 d, 62 d e 31 d de armazenamento.

De acordo com os provadores o lote de sangria com 31 d foi o que apresentou maior carácter frutado. O aroma a “laranja” e “limão”, que são atributos de interesse em sangrias, estavam mais representados nos lotes mais recentes, isto é, com 62 d e 31 d de armazenamento. O aroma a “canela” e a “hortelã”, que são outras notas de interesse em sangrias, foram mais evidentes, na opinião dos provadores, no lote com 356 d. Neste lote também foram referidos defeitos aromáticos como “suor de cavalo” e “medicinal”.

Em suma, os lotes com mais tempo apresentaram menor carácter frutado e os descritores “acetaldeído”, “cozido”, “metional”, “fruta em passa”, “fumado” foram mais evidentes no lote com 396 d. Segundo Liu *et al.* (2016) isto pode ser explicado porque a oxidação apropriada do

envelhecimento em garrafa causa a conversão de etanol em acetaldeído, e o acetaldeído resultante é ainda conjugado com taninos ou antocianinas no vinho. Os aromas frutados e produzidos pela fermentação desaparecem no envelhecimento em garrafa, e ao mesmo tempo começam a exibir os aromas oxidados. Com o envelhecimento, também podem surgir odores descritos como “legumes cozidos” (metional), “vegetal”, “licor” e “cidra”, que reduzem significativamente a qualidade do vinho.

Relativamente ao parâmetro sabor, apesar de ser notória a semelhança dos lotes, a partir do gráfico, estes distanciaram-se ligeiramente nos descritores frutado, *off-flavour*, doçura, adstringência e amargor. Segundo os provadores, os lotes mais recentes possuíram maior carácter frutado, menor *off-flavour*, maior doçura, menor adstringência e menor amargor. O carácter frutado dos lotes com 62 d e 31 d foram de 5,76 e 5,96 de pontuação média. Nos outros dois lotes, com 396 d e 356 d, a pontuação foi de 5,04 e 5,36, respetivamente. Portanto, o carácter frutado dos lotes, foi apenas ligeiramente forte, nos lotes mais recentes e moderado nos lotes com mais tempo de armazenamento. O descritor *off-flavour* foi extremamente fraco e muito fraco em todos os lotes, tendo sido superior no lote com 356 d, com 3,40 de pontuação média. O lote com 31 d foi o mais doce com 7,16 de atribuição média, o que, segundo a escala utilizada na análise sensorial, é considerado forte. Os atributos da adstringência e do amargor foram considerados fracos e foram superiores no lote com maior tempo de armazenamento (com 4,4 de pontuação média).

Os restantes descritores, nomeadamente especiarias, acidez, álcool, frescura, estrutura/corpo, equilíbrio, fim de boca, diluição e presença de gás foram semelhantes em todos os lotes. Desses atributos, de acordo com os provadores, o álcool e a diluição foram fracos e os demais descritores foram moderados.

Desta prova descritiva parece concluir-se que os lotes com 396 d e de 356 d continuam a ser de qualidade sensorial satisfatória, mesmo possuindo, sensivelmente, 1 ano de armazenamento. Isto porque, alguns atributos de exclusão em termos de qualidade, nomeadamente a evolução de cor, foi considerada moderada, e o odor desagradável e o *off-flavour* foram considerados fracos.

Nesta prova sensorial também foi solicitado aos provadores que atribuissem uma apreciação global média ( $A_{gn}$ ) de, 0 a 20, aos lotes de sangria. Os resultados obtidos para a apreciação global dos 4 lotes de sangria avaliados estão presentes na Figura 27.

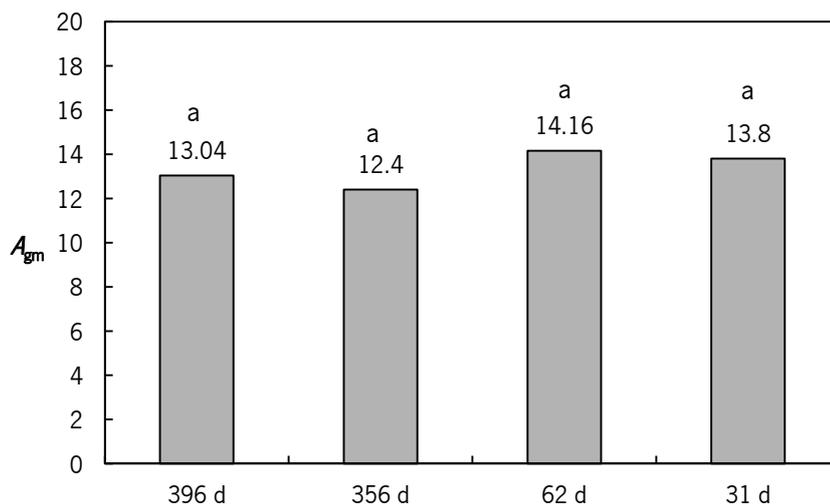


Figura 27 – Resultados da apreciação global média ( $A_{gm}$ ) de 4 lotes de sangria de diferentes tempos de armazenamento.

Como se pode verificar pela Figura 27, os lotes mais recentes de sangria obtiveram uma maior apreciação global em relação às sangrias com um ano de armazenamento, mas essa diferença não pode ser considerada significativa ( $p < 0,05$ ). Posto isto, as sangrias dos lotes com maior tempo de armazenamento continuam a ser apreciadas, o que quer dizer que, se a sangria for produzida nas mesmas condições, poderá haver garantia da sua qualidade sensorial da sangria após um ano.

#### 4.3.3.2 Teste de Preferência

Além da análise sensorial descritiva foi realizado um teste de preferência dos 4 lotes de sangria por ordenação. Os resultados foram submetidos a um teste estatístico não paramétrico de Friedman (Tabela 30).

Tabela 30 – Resultados do teste de preferência por ordenação de 4 lotes de sangria com diferentes tempos de armazenamento

Provedor/Lotes	Lote 396 d	Lote 356 d	Lote 62 d	Lote 31 d
Soma	55 <sup>a</sup>	54 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	69 <sup>a</sup>

letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Através da Tabela 30 foi possível verificar que apesar dos lotes mais recentes terem obtido maior preferência, constatou-se que não ocorreram diferenças significativas estatisticamente ( $p < 0,05$ ). É importante referir que, mesmo não podendo ser comparáveis os lotes de sangria no teste de preferência, uma vez que as sangrias foram produzidas com diferentes vinhos e, por consequência, o “caráter aromático” e a “evolução” são distintos, as sangrias com um ano demonstraram possuir ainda o perfil desejado por alguns provedores.

## 4.4 Novas Formulações de Sangria

### 4.4.1 Teste de Preferência por ordenação

Além da sangria *Casal Garcia* foram desenvolvidas 5 outras formulações. Tendo em conta o Reg. (UE) n.º 251/2014, adicionaram-se novos ingredientes permitidos, nomeadamente, geleia de alfarroba para simular o xarope de alfarroba, licor de pêssego para simular o aroma de pêssego, aroma de limão, gengibre, mel e canela.

Na Tabela 31 encontram-se os resultados da soma da ordenação de 40 provadores das 5 formulações de sangria.

Tabela 31 – Resultados do teste de preferência por ordenação crescente de 5 formulações de sangria

Provador/Formulação	Licor de pêssego	Geleia de Alfarroba	Aroma de limão	Gengibre	Mel e Canela
Soma	111 <sup>a</sup>	124 <sup>a</sup>	109 <sup>a</sup>	126 <sup>a</sup>	130 <sup>a</sup>

letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Na análise dos resultados obtidos pelo teste de preferência por ordenação foi efetuado um teste estatístico de Friedman, sendo possível concluir que não existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para as 5 formulações de sangria. No entanto, a formulação com mel e canela foi a mais apreciada e a seguir foi a de gengibre. O facto de não terem ocorrido diferenças significativas na preferência deve-se, provavelmente, ao facto, de haver provadores que não gostavam do ingrediente canela, sendo portanto, logo à partida a sangria menos preferida para esses provadores. Daí a sangria com canela não se distanciar mais, em relação às outras formulações. Da sangria com mel e canela referiram que possuía aroma e sabor agradáveis e notáveis a mel, que possuía demasiada canela e que era muito doce. Da sangria que possuía aroma a limão, mencionaram que era mais forte, menos doce, mais persistente, com adstringência adequada e que era um pouco amarga no fim-de-boca. Relativamente à sangria com gengibre foi dito que era a mais doce, era frutada, era equilibrada, que tinha um sabor mais subtil e que tinha um ligeiro aroma a canela. Em relação à sangria com geleia de alfarroba foi dito que a componente aromática era pouco intensa, um pouco adstringente e doce. Por fim, da sangria com licor de pêssego, conseguiram detetar o aroma dessa fruta, salientado que era equilibrada, muito frutada, diferenciadora e que o aroma combinava bem numa sangria tinta. Detetaram ainda um aroma a rebuçado nessa sangria.

#### 4.4.2 Teste de Aceitação e Intenção de Compra

No Reg. (UE) n.º 1131/2011 ainda não é referido um limite da quantidade de glicosídeos de steviol que pode ser adicionada em bebidas aromatizadas à base de vinho, que é o caso da sangria. No entanto, houve interesse em testar em sangria, uma vez que é um edulcorante que poderá vir a ser permitido.

Foi realizado um teste de aceitação, a uma sangria com a formulação original da *Casal Garcia*, mas com a substituição do mosto concentrado retificado por glicosídeos de steviol provenientes da planta *Stevia rebaudiana*. O teste foi realizado com uma escala hedônica de 9 para a aceitação e de 5 pontos para a intenção de compra. Na ficha de prova (Anexo III) era solicitada a idade e o género do provador, cujos resultados são apresentados na Figura 28.

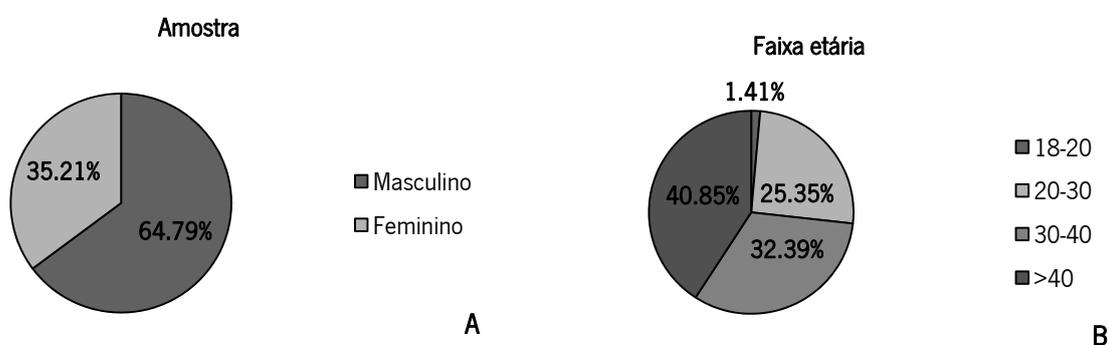


Figura 28 – Distribuição dos provadores do teste de aceitação relativamente ao género (A) e relativamente à faixa etária (B).

Na prova de aceitação os 71 provadores a amostra foram maioritariamente do sexo masculino (64,79 %), com uma maior parcela de idades entre os 20 e os 40 anos (57,74 %) e a seguir idades superiores a 40 anos (40,85 %).

Os resultados do teste de aceitação encontram-se na Figura 29, onde é possível verificar que a sangria com glicosídeos de steviol teve, em geral, uma boa apreciação.

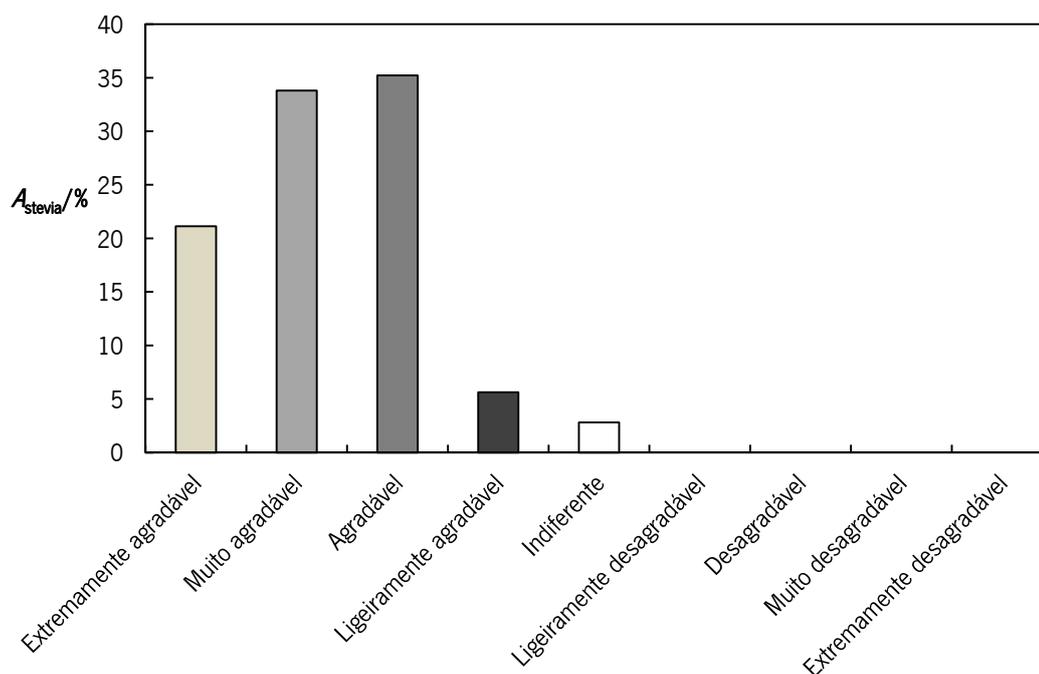


Figura 29 – Resultados do teste de aceitação ( $A_{\text{stevia}}$ ) de sangria com stevia de uma escala hedónica de 9 pontos.

Apenas 8,45 % (os que responderam ligeiramente agradável e indiferente) tiveram uma opinião menos positiva. No entanto, apesar de o balanço ter sido positivo em termos de apreciação, seria interessante fazer um estudo com uma maior amostra de provadores e com uma faixa etária mais jovem, de modo a obter um estudo mais fidedigno.

Em relação à sangria em avaliação, os aspetos positivos mais evidenciados nos comentários foram o sabor e aroma agradáveis e frutados a pêssego, a banana, a citrinos e a canela, a doçura e corpo equilibrados com boa adstringência, a ligeira acidez, a frescura, paladar aveludado e uma boa cor rubi (stevia equivalente a 70 g/L de sacarose). Relativamente aos aspetos negativos, sendo alguns deles controversos, foi referido que a sangria apresentava um ligeiro defeito aromático (sulfuroso) e ligeiro “*after taste*” menos agradável e sabor láctico, era demasiado doce, ficando o doce no final da boca, sensação de adoçante, final com pouco volume e amargo, acidez acentuada semelhando-se a um vinho verde e que deveria ter mais gás e mais álcool. Foi ainda referido que o sabor era pouco frutado e que sabia muito a vinho, mas estas opiniões devem-se ao facto de os provadores terem uma ideia de que a sangria deve ser acompanhada com pedaços de fruta. Neste estudo, o objetivo era verificar a aceitação de uma sangria *ready-to-drink*, sem qualquer tipo de acompanhamento. Apesar destes aspetos menos bons, os resultados da intenção de compra revelados (Figura 30) foram positivos.

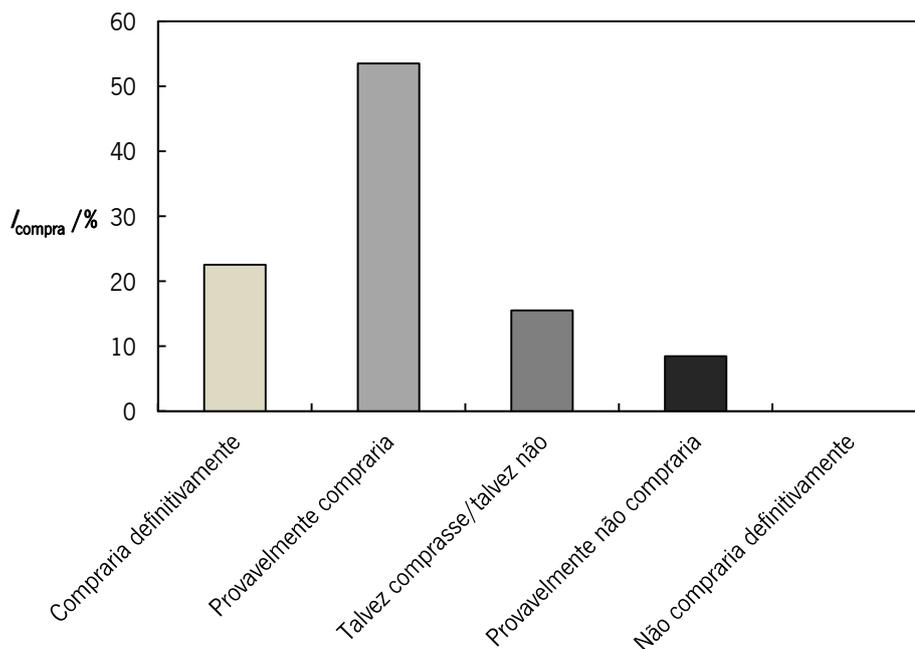


Figura 30 – Resultados do teste de intenção de compra ( $I_{compra}$ ) da sangria com stevia de uma escala hedónica de 5 pontos.

Relativamente à intenção de compra, esta foi unânime em relação à apreciação, verificando-se que quase 25 % dos provadores decididamente comprariam a sangria. Mais de metade (53,52 %) referiram que provavelmente comprariam, o que foi um resultado bastante positivo. Os restantes provadores não demonstraram ser determinados no poder de compra da sangria avaliada.

#### 4.4.3 Teste de deteção de diferenças

##### 4.4.3.1 Deteção do ingrediente gengibre

Foi realizado um teste triangular (teste de deteção de diferenças) para testar se a introdução do ingrediente gengibre em pó (raiz), numa quantidade de 0,01 g/L era perceptível em sangria. De 40 provadores não treinados para a deteção desta especiaria, 15 provadores detetaram esse ingrediente. Tendo em conta a Tabela A.1 apresentada na ISO 4120, era necessário que 20 provadores acertassem na amostra de sangria com gengibre, para ter um nível de confiança de 95 %. Assim, não se pode concluir que as amostras de sangria sejam diferentes. Alguns provadores que detetaram a diferença referiram que a sangria possuía um aroma superior a limão e a canela e que era mais adocicada. O gengibre, mais concretamente a raiz, contém óleo essencial e oleoresina, que são responsáveis pelo seu comportamento aromático e picante, respetivamente (An *et al.*, 2016).

Num estudo elaborado por Habibi *et al.* (2014) foram avaliados os compostos aromáticos da raiz de gengibre por GC/MS. No óleo de gengibre foram identificados 12 constituintes, nomeadamente

zingiberene,  $\beta$ -sesquifelandreno, sabineno,  $\alpha$ -curcumeno e  $\beta$ -bisaboleno, como principais componentes. Nesse estudo, o óleo continha 98,7 g/L de  $\beta$ -bisaboleno, um dos compostos responsáveis pelo aroma a limão. Outro composto importante, identificado foi o eugenol, com 1,54 g/L. Este composto é um dos responsáveis pelo aroma a canela e encontrava-se em quantidades acima do limiar de percepção em solução hidroalcoólica (5  $\mu$ g/L) referida por Ferreira *et al.* (2000). Daí, a possibilidade do provador na prova das sangrias ter detetado um aroma superior a canela na sangria com gengibre.

Neste teste triangular o objetivo era que o ingrediente gengibre, mais concretamente, o sabor picante fosse detetado, uma vez que é um sabor de interesse em sangrias.

#### 4.4.3.2 Alteração do edulcorante

Um outro teste triangular efetuado foi um teste com a formulação original de sangria Casal Garcia, cujo edulcorante utilizado foi mosto concentrado retificado (MCR), e outra com glicosídeos de steviol em pó da planta *Stevia Rebaudiana* (98 %) e Eritritol (2 %). Esta prova foi efetuada devido ao facto da sangria com extrato de stevia ter obtido uma boa aceitabilidade no teste de aceitação. Em prova estiveram 40 provadores, dos quais 22 detetaram a sangria que possuía o extrato de stevia. Segundo a Tabela A.1 da ISO 4120, teriam de acertar na sangria com stevia 20 e 22 provadores para um nível de significância de 95 % e 99 %, respetivamente. Portanto, uma vez que, 22 provadores detetaram a diferença, pode-se concluir que as amostras de sangria são diferentes, com 99 % de confiança. Neste caso, a alteração do edulcorante na formulação da sangria *Casal Garcia* poderá ser perceptível pelo consumidor. Os provadores referiram que a amostra com o extrato de stevia possuía menos corpo, o que é demonstrado pelo menor extrato seco total (34,23 g/dm<sup>3</sup>) quando comparado com o da sangria com MCR (119,91 g/dm<sup>3</sup>). Também foi referido que a sangria com stevia possuía um maior amargor em boca designado por sensação “vegetal” e que proporcionava uma sensação de maior doçura, o que não era de esperar, visto ter sido feita a conversão correta do poder edulcorante do extrato de stevia em relação ao MCR na formulação. Os extratos de stevia puros, geralmente produzem um gosto amargo significativo, o que vai ao encontro do que foi referido pelos provadores (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).

Os glicosídeos de steviol são cerca de 300 vezes mais doces do que a sacarose, com as vantagens adicionais de ter poder energético nulo, zero hidratos de carbono, não são fermentáveis e não causam picos nos níveis de açúcar no sangue (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Em termos de legislação, no documento de gestão da exposição de glicosídeos de steviol da EFSA (2011), não é referido limite para bebidas alcoólicas aromatizadas, mas sim para bebidas constituídas por uma mistura de uma bebidas

não-alcoólicas com cerveja, cidra, *perry*, bebidas espirituosas ou vinho, indicando um limite de 450 mg/L. Nesta prova a sangria possuía 23,92 g/L de extrato de stevia, o que excede o limite apresentado, mesmo não sendo o limite para bebidas aromatizadas à base de vinho.

#### 4.4.3.3 Processamento pelo calor

O último teste de deteção de diferenças foi realizado com o objetivo de verificar, se era detetada uma sangria Casal Garcia pasteurizada a 60 °C durante 20 min, em banho termostato. De 37 provadores, 14 identificaram a sangria pasteurizada. Através da Tabela A.1 da ISO 4120 é possível verificar que seria necessário que 18 provadores reconhecessem a sangria pasteurizada, para ter um nível de confiança de 95 %. Como tal não se verificou, não se pode concluir que as amostras de sangria pasteurizada e não pasteurizada sejam diferentes. Assim, este tipo de processamento poderá vir a ser incluído no processo de fabrico de sangria. Os provadores referiram que a sangria pasteurizada era mais doce, parecia possuir menos álcool, menos corpo, menos aroma e que era mais fresca. Foram realizadas análises físico-químicas à sangria pasteurizada e não pasteurizada e os resultados foram submetidos a uma análise de variância com um teste de Tukey, para verificar se tinham ocorrido alterações significativas, o que está presente na Tabela 32.

Da análise de variância (Anova) para todos os parâmetros físico-químicos, pode-se concluir que não ocorreram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a sangria processada e não processada. No entanto, no parâmetro SO<sub>2</sub> livre a sangria pasteurizada obteve valor mais baixo, o que não era de esperar pois, segundo Jackson (2008) a ação da temperatura faz aumentar o teor em SO<sub>2</sub> livre, porque uma parte do SO<sub>2</sub> combinado é libertado pelo calor.

Tabela 32 – Resultados das análises físico-químicas de sangria não pasteurizada e pasteurizada

Parâmetros Físico-Químicos	Sangria Não Pasteurizada	±	Sangria Pasteurizada	±
$C_{SO_2 \text{ livre}} / (\text{mg/L})$	43,33 <sup>a</sup>	6,25	41,67 <sup>a</sup>	2,87
$C_{SO_2 \text{ total}} / (\text{mg/L})$	105,67 <sup>a</sup>	2,87	107,00 <sup>a</sup>	0,00
<i>TAV</i> /%	7,77 <sup>a</sup>	0,47	7,81 <sup>a</sup>	0,44
<i>SR</i> /(g/L)	112,97 <sup>a</sup>	1,67	113,43 <sup>a</sup>	3,60
<i>EST</i> /(g/dm <sup>3</sup> )	134,55 <sup>a</sup>	1,51	134,01 <sup>a</sup>	4,80
<i>L</i> *	41,17 <sup>a</sup>	2,48	42,48 <sup>a</sup>	1,36
<i>a</i> *	53,29 <sup>a</sup>	3,15	54,67 <sup>a</sup>	1,44
<i>b</i> *	-37,02 <sup>a</sup>	6,02	-38,63 <sup>a</sup>	2,53
<i>C</i> *	64,89 <sup>a</sup>	5,99	66,94 <sup>a</sup>	2,61
<i>H</i> *	-0,61 <sup>a</sup>	0,05	-0,62 <sup>a</sup>	0,02

letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

A sangria pasteurizada possui maior teor alcoólico 7,81 %, apesar de não haver diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Este facto, contrariou o que foi referido na análise sensorial. De acordo com Brugirard e Rochard (1991), no tratamento térmico existem perdas na ordem de 0,03 % a 0,15 %, no que respeita a *TAV*, dependendo do método, temperaturas e tempos usados. A sangria pasteurizada é também mais doce (113,43 g/L) e possui menor extrato seco (134,01 g/dm<sup>3</sup>), o que se reflete em menor corpo em boca. Estes factos vão ao encontro do que foi exposto em análise sensorial.

Em relação à componente aromática, os provadores que acertaram disseram que a sangria pasteurizada era menos intensa e outros referiram o contrário, não salientando o tipo de aroma.

Uma das consequências menos desejadas da pasteurização é o seu possível efeito sobre as características gustativas, nomeadamente o designado aroma a cozido, principalmente proveniente do composto 3-(metiltio)-propionaldeído (metional), ou ainda, a possível maior rapidez de envelhecimento. Outros compostos voláteis possíveis de surgir são o fenilacetaldéido, com notas de mel e a 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona (sotolon), com notas de caril. Este tipo de problemas podem ocorrer caso a concentração de oxigénio dissolvido no vinho, aquando do tratamento térmico, seja elevada (Ezequiel, 2010; Oliveira, 2011; Pilone, 1953). Além disso, como a sangria possui bastante açúcar pode ocorrer caramelização através da reação de *Maillard*, uma reação que envolve a condensação de açúcares redutores com aminoácidos e proteínas durante o processamento e, porventura durante o armazenamento (Li *et al.*, 2008). Da reação de *Maillard* podem-se formar os compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural, que são ambos produtos da degradação do açúcar (por caramelização ou formado durante o processamento e armazenamento de vinho). Esses compostos e o ácido glioxílico, resultante da oxidação de ácido tartárico, reagem diretamente com flavonoides e conduzem à formação de compostos xantílo, amarelo-alaranjado (Es-Safi *et al.*, 2000). No que respeita às coordenadas de cor do espaço CIELab apresentadas na Tabela 32, a componente  $b^*$ , referente a tons de azul/amarelo foi ligeiramente superior na sangria pasteurizada (-38,63), apesar de a diferença não ser significativa, isto é, está mais longe de tons amarelados do que a sangria não pasteurizada. No entanto, a leitura de cor das sangrias deveria ter sido efetuada mais tarde, para, de facto, verificar se se mantinham da mesma forma, ao longo do tempo. Alexandre *et al.* (1996) compararam alguns compostos aromáticos ao longo da conservação de um vinho filtrado e de um pasteurizado e concluíram que o teor inicial é menor nos vinhos pasteurizados bem como a sua diminuição ao longo do seu tempo de conservação.

Tal como foi referido em materiais e métodos, o binómio 60 °C vs 20 min foi utilizado devido ao facto de inativar os microrganismos indesejáveis (Briggs *et al.*, 2004). Não foram realizadas análises microbiológicas à sangria pasteurizada porque teria mais interesse em fazê-lo a uma sangria sem

qualquer tipo de conservante e não com o sorbato de potássio, pois já era sangria engarrafada. Em laboratório, realizar a pasteurização a uma sangria sem conservante e acondicionada, de forma correta e de forma estéril, era um processo mais difícil de executar devidamente, e de fazê-lo simulando a escala real.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO

O trabalho desenvolvido na Aveleda, SA teve como objetivos a caracterização e comparação de sangrias tintas comerciais com a Sangria Casal Garcia. Um outro objetivo, correspondeu à determinação do tempo de prateleira da Sangria Casal Garcia através de ensaios de envelhecimento acelerado. Além destes objetivos, foi realizado um controlo de qualidade a 4 lotes de sangria, com diferentes tempos de armazenamento. Como complemento, neste trabalho de dissertação, foram produzidas novas formulações de sangria e foi testada a pasteurização na sangria Casal Garcia.

Em relação à caracterização físico-química de sangrias comerciais e a sua comparação com a sangria Casal Garcia e com uma desenvolvida, pode-se dizer que 55,6 % das sangrias avaliadas possuem o conservante ácido sórbico na sua composição. Apenas uma marca continha polpa de fruta.

Relativamente aos conservantes em estudo, no processo de envelhecimento, o DMDC foi o que demonstrou ter maior espectro de ação microbiana nos indicadores avaliados, relativamente ao sorbato de potássio, pois só ocorreu ligeira fermentação ao fim de 124 d. Apesar do DMDC ter tido uma melhor eficácia no envelhecimento, na avaliação microbiológica dos lotes de sangria Casal Garcia com mais de um ano, que possuem sorbato de potássio, as análises microbiológicas também foram satisfatórias. Portanto, além do SO<sub>2</sub> adicionado à sangria, verificou-se que o conservante sorbato de potássio demonstrou garantir a estabilidade do produto em termos microbiológicos e, por conseguinte, a prevenção da produção de compostos voláteis indesejáveis, provenientes do metabolismo microbiano. Assim, se a sangria for produzida nas mesmas condições, foi possível averiguar a garantia de estabilidade microbiana da sangria Casal Garcia no período de um ano.

Para trabalhos futuros, seria interessante ainda incluir um controlo microbiológico de bactérias lácticas com o meio MRS ou *WL Differential agar*, aquando dos engarrafamentos da sangria, além do procedimento habitual na Aveleda, SA com o meio *WL nutrient agar*.

O composto *trans,trans-2,4-hexadien-1-ol* (precursor do odor a gerânio) que pode ser produzido pelas bactérias lácticas não foi identificado nas sangrias Casal Garcia no ensaio de envelhecimento. Os compostos limoneno e cinnameldeído, presentes no aroma industrial adicionado à sangria, não foram possíveis de quantificar, devido à sobreposição de tempos de retenção de outros compostos. Como tal, sugere-se, para trabalho futuro, a utilização de uma coluna com diferente polaridade, para que isso se torne possível.

Como trabalho futuro, seria interessante avaliar físico-química e sensorialmente sangrias com os conservantes SP e DMDC filtradas, em membrana a 0,45  $\mu\text{m}$ , num ensaio de envelhecimento acelerado, em vez de apenas 1  $\mu\text{m}$ , porque nas sangrias controlo e com sorbato de potássio ocorreu fermentação, o que interferiu nas análises físico-químicas. Com a existência de fermentação, não foi possível determinar o tempo de prateleira a partir dos compostos voláteis, uma vez que, ocorreram oscilações da concentração de ésteres, ao longo do tempo. Por esse motivo, o tempo de prateleira foi calculado a partir da cor, concretamente a partir da coordenada  $b^*$  de sangrias tratadas com sorbato de potássio.

Para o cálculo do tempo de prateleira ( $t_p$ ) foi tido em conta uma reação de 1.<sup>a</sup> ordem (evolução da coordenada  $b^*$  antes de atingir valores positivos, que indicam a cor amarela). Obteve-se uma energia de ativação de 126,03 kJ/mol e um fator de aceleração de 27,18. Com base nesse fator, extrapolou-se o tempo para 20 °C e o tempo de prateleira obtido da sangria Casal Garcia foi de 28 meses. A partir de  $Q_{10}$  o tempo de prateleira obtido foi de 10 meses. Na análise das coordenadas de cor dos lotes de sangria com cerca de 1 ano, a coordenada  $b^*$  (azul/amarelo) ainda possuía valores negativos em todos os lotes, o que indica pouco envelhecimento. Portanto, mesmo que a base vínica dos lotes não tenha sido a mesma que as sangrias do ensaio de envelhecimento, e tendo em conta apenas o parâmetro de qualidade cor, o tempo de prateleira da sangria Casal Garcia é mais de um ano. Para saber a partir de que momento poderá haver rejeição do produto, sugere-se que sejam realizadas análises sensoriais e microbiológicas após esse período, eventualmente para confirmar se o tempo de prateleira da sangria seja os 28 meses.

Relativamente ao controlo de qualidade dos lotes de sangria Casal Garcia, verificou-se que não ocorreu fermentação e que os valores de  $\text{SO}_2$  livre demonstraram ser suficientes para o controlo microbiano. Portanto, se a sangria for produzida nas mesmas condições poderá manter-se estável durante o período de 1 ano. Além do  $\text{SO}_2$ , a sangria Casal Garcia contém sorbato de potássio, por isso, sugere-se para trabalho futuro realizar, após 1 ano, 1 ano e meio e 2 anos, análises físico-químicas, essencialmente do  $\text{SO}_2$  livre e análises microbiológicas complementares a lotes de sangria, de forma a verificar o espectro de ação de ambos os conservantes. Também seria importante, fazer a avaliação sensorial desses lotes, porque a sangria pode estar protegida a nível microbiológico, e a nível sensorial deixar de ter as características desejáveis.

Da prova descritiva dos 4 lotes de sangria Casal Garcia, concluiu-se que, os lotes com 396 d e de 356 d continuam a ser de qualidade sensorial satisfatória, uma vez que, os atributos de exclusão em

termos de qualidade, nomeadamente, a evolução de cor foi considerada moderada, e o odor desagradável e o *off-flavour* foram considerados fracos.

Das 5 formulações de sangria desenvolvidas, constatou-se que a sangria com mel e canela foi a mais predileta, mas essa preferência não foi significativa. A sangria com glicosídeos de steviol possuiu uma boa aceitabilidade e uma boa intenção de compra. Portanto, a utilização deste edulcorante demonstrou ser promissora em sangrias, apesar de ainda não ser permitido. No entanto, seria necessário realizar um estudo de mercado mais alargado. Além disso, esse edulcorante demonstrou que poderá ser detetado em sangrias pelo consumidor. Caso a sua utilização venha a ser permitida em vinhos/sangrias, poderá ser desenvolvida uma sangria *light*, uma vez que os glicosídeos de steviol possuem um poder calórico nulo. Por último, no teste de deteção de sangria pasteurizada averiguou-se que a pasteurização poderá ser incluída no processo de produção de sangria Casal Garcia.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, J.L. Aleixandre, M.J. García, V. Lizama (2006). Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta*, 563: 109–115.
- Alañón, M. E., Schumacher, R., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Hermosín-Gutiérrez, I., & Pérez-Coello, M. S. (2013). Enological potential of chestnut wood for aging Tempranillo wines Part II: Phenolic compounds and chromatic characteristics. *Food Research International*, 51: 536–543.
- Aleixandre, J.L., Contreras, M.J., Alvarez, I. (1996). Influence du traitement de stabilisation microbiologique sur la conservation des vins Malvasia. *Rivista di viticoltura e di enologia*, 4.
- An, K. , Zhao, D. , Wang, Z. , Wua, J., Xu, Y. Xiao, G. (2016). Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. *Food Chemistry*, 197: 1292–1300.
- Antalick, G. Perello, M.C. Revel, G. (2010). *Food Chemistry*, 121: 1236–1245.
- Armanino, C. Casolino, M.C. Casale, M. Forina, M. (2008). *Analytica Chimica Acta*, 614, 134–142.
- Aveleda (2011). *Aveleda, SA: informação online*. URL: <<http://www.aveledaportugal.pt/>> Consultado em 31 de Outubro de 2015.
- Aveleda (2015). *Documentação interna da empresa Aveleda, SA*.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Fernández-Molina, J.J., Alzamora, S.M., Tapia, M.S., LopezMalo, A., and Chanes, J.W. (2003). General consideration for preservation of fruits and vegetables. In handling and preservation.
- Baty, F. e Delignette-Muller, M. (2004). Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *International Journal of Food Microbiology*, 91(3): 261-277.
- Bely, M., *et al.* (2003). Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal Bioscience Bioengineering*, 96, (6):507-12.
- Boidron, J.N., Chatonnet, P., Pons, M. (1988). Influence du bois sur certaines substances odorants des vins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 22: 275–294.
- Briggs, E. D., Boulton, C. A., Brookes, P. A., & Stevens, R. (2004). *Brewing Science and practice*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press.
- Brugirard, A., Rochard, J. (1991). Aspects pratiques des traitements thermiques des vins. *Avenir O`Enologie*, 130-190.

- Burton, H. S., McWeeny, D. J., and Biltcliffe, D. O. (1963). Nonenzymic browning: The role of unsaturated carbonyl compounds as intermediates and of SO<sub>2</sub> as an inhibitor of browning. *Journal Science Food and Agricultural*, 14: 911–920.
- Calligaris, S. e Manzocco L. (2012). Critical indicators in shelf life assessment. In: “*Shelf life assessment of food*”. M.C. Nicoli (Ed.), pp. 61. CRC press; Boca Raton, Florida.
- Costa, A., Barata, M. Malfeito-Ferreira, V. Loureiro (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25: 422–427.
- Chatonnet, P., Dubordieu, D., Boidron, J.N. (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* spp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 463–468.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J.N., Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of Science of Food and Agricultural*, 60:165–178.
- Chaves, M., Zea, L., Moyano, L., & Medina, M. (2007). Changes in color and odorant compounds during oxidative aging of pedro ximenez sweet wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3592–3598.
- Coelho, E. Perestrelo, R. Neng, N.R., Camara, J.S. Coimbra, M.A. Nogueira, J.M.F. Rocha, S.M. (2008). *Analytica Chimica Acta*, 624: 79–89.
- Cozzolino, D. e Damberg, R. G.(2010). Instrumental analysis of grape, must and wine. In: *Managing and wine quality*, Reynolds, A.G., 5, 1: 134-155.
- Crowell, E.A. and Guymon, J.F. (1975). Wine constituents arising from sorbic acid addition and identification of 2-ethoxyhexa-3,5-diene as a source of geranium like off-odor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 26: 97–102.
- Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54: 73–85.
- Danilewicz, J. C. (2007). Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine model system: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58: 53–60.
- De Ley, J., Gillis, M. e Swings, J. (1984a). Family VI Acetobacteraceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, Williams e Wilkens, Maryland, U.S.A., 267-268.
- Delfini, C., L. Conterno, G. Carpi, P. Rovere, A. Tabusso, C. Cocito, and A. Amati. (1995). Microbiological stabilisation of grape musts and wine by hydrostatic pressures. *Journal of Wine Research*, 6: 143–151.
- Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., Ambrò, S. (2002). Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 5605-5611.

- DeMarchi, R., Monteiro, M., & Cardello, M. H. A. B. (2003). Avaliação da vida-de-prateleira de um isotônico natural de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). *Brazilian Journal of Food Technology*, 6: 291–300.
- Dias, L., S. Pereira-da-Silva, M. Tavaares, M. Malfeito-Ferreira, and V. Loureiro (2003). Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology*, 20: 377–384.
- Diretiva 95/2/CE do Conselho de 20 de fevereiro de 1995, relativa aos aditivos alimentares com exceção dos corantes e edulcorantes, Jornal Oficial (L 61) de 18 de Março de 1995.
- Divol, B., Strehaiano, P., Lounvaud-Funel, A. (2005). Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiology*, 22: 169–178.
- Du Toit, W.J, Pretorius, I.J. (2002). The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, 52: 155–179.
- Du Toit, W.J. and M.G. Lambrechts (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 57–64.
- Du Toit, W.J., Pretorius, I.J., Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 862–871.
- Edinger, W.D. and Splitstoesser, D.F. (1986). *Production by lactic acid bacteria of sorbic alcohol, the precursor of geranium odor compound. American Journal of Enology and Viticulture*, 37: 34–38.
- EFSA (*European Food Safety Authority*) (2011). *Revised exposure assessment for steviol glycosides for the proposed uses as a food additive*.  
URL: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.1972/epdf>> Consultado em 15 de Julho de 2016.
- Embs, R. J., and Markakis, P. (1965). The mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase. *Journal of Food Science*, 30: 753–758.
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*, 77: 325–331.
- Es-Safi, N. E., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). New phenolic compounds formed by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic solution and their implication in color changes of grape-derived foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4233–4240.
- Etiévant, P. X. (1991). Wine. In: *Volatile Compounds in Foods and Beverages* (H. Maarse, ed.), 483–546. Marcel Dekker, New York.

- Ezequiel, M. M. R. L. (2010). Ensaios de tratamentos térmicos em vinhos tintos. Efeitos na composição físico-química e análise sensorial; Dissertação (Mestrado em viticultura e enologia) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa; Lisboa, Portugal.
- Ferreira, V. Lopez, R, Cacho, J.F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of Science Food Agricultural*, 80: 1659–1667.
- Fieldwork quality (2015). *Relatório de um estudo de mercado de sangria*. Documentação Aveleda, 35pp.
- Fieldwork quality (2014). *Quality at the heart of market research*.
- Flanzy, C. *et al.* (1998). Oenologie: Fondements Scientifiques et Technologiques. *Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires*. Tec&Doc Lavoisier, Paris.
- Franco, B.D.G.M. e Landgraf, M. (2004). Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Ed. Atheneu, 182 pp.
- FSAI (2005). Food Safety Authority of Ireland. Guidance Note N.º18 – *Determination of food shelf-life*. Dublin, Ireland, URL: <<http://www.fsai.ie>> . Consultado em Outubro de 2015.
- Fugelsang, K.C. e Edwards, C.G. (2007). Wine Microbiology: Principles and Applications. In: *Wine Spoilage*, 11: 162-179, 2ªEd., New York, Springer Science and Business Media.
- Galić, K.; Curić, D.; Gabrić, D. (2009). Shelf life of packaged bakery goods – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 405-426.
- Generally Recognized as Safe (GRAS). *U.S. FDA* (2012). URL: <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/default.htm>>. Consultado em 15 de janeiro de 2016.
- Genisheva, Z., Vilanova, M., Mussatto, S.I., Teixeira, J.A., Oliveira, J.M. (2014). Consecutive alcoholic fermentations of white grape musts with yeasts immobilized on grape skins – Effect of biocatalyst storage and SO<sub>2</sub> concentration on wine characteristics. *LWT – Food Science and Technology*, 59: 1114–1122.
- Gordon, L., e Robertson, A. (2000). Food packaging: Principles and practice. New York, NY, USA: Marcel Dekker Inc.
- Gould, G.W., and N.J. Russell. (2003). Major, new, and emerging food-poisoning and food-spoilage microorganisms. In: *Food Preservatives*, N.J. Russell and G.W. Gould (eds.), 1–14. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- GSFA, (2012). URL: <<http://www.codexalimentarius.net>>. Consultado em 8 de Dezembro de 2015.
- Guth, H. (1997a). Identification and character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3027–3032.

- Habibi, R., Sadeghi, GH. and Karimi, A. (2014). Effect of different concentrations of ginger root powder and its essential oil on growth performance, serum metabolites and antioxidant status in broiler chicks under heat stress. *British Poultry Science*, 2, 55: 228–237.
- Henick-Kling, T. (1993). Malolactic fermentation. In: *Wine microbiology and biotechnology*. Chur: Harwood Academic.
- Henick-Kling, T., Egli, C., Licker, J., Mittrakul, C. & Acree, T. E. (2000). In *Proceedings of the 5th international symposium on cool climate viticulture and oenology*, Melbourne, Australia, 16–20 January.
- Huang, T. C., Chung, C. C., Wang, H. Y., Law, C. L., & Chen, H. H. (2011). Formation of 6-shogaol of ginger oil under different drying conditions. *Drying Technology*, 29: 1884–1889.
- Huis, In't Veld, J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 1-18.
- Hutkins, R.W. (2006). Wine fermentation In: *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. IFT Press, Blackwell Publishing, 1<sup>a</sup>Ed. USA, 349-396.
- Hutkins, R.W. (2006a). Microorganisms and Metabolism In: *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. IFT Press, Blackwell Publishing, 1<sup>a</sup>Ed. USA, 349-396.
- IFST (1993). *Shelf Life of Foods – Guidelines for its Determination and Prediction*. London: Institute of Food Science & Technology.
- Jackson, R.S.(2002). Introduction. In *Wine Tasting: A professional Handbook. Food Science and International Series*. Cap. 1, Elsevier Academic Press, 1-14.
- Jackson, R.S. (2008). *Wine Science: Principles and Applications*, 3<sup>rd</sup> Edition, San Diego, CA, Academic Press.
- Jackson, R.S. (2011). Shelf-life of wine. In: *Food and Beverage Stability and Shelf-life*. Kilcast, D., Subramaniam P. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 8: 540-570.
- Jacobson, J.L. (2006). Vineyard to Harvest. In: *Introduction to Wine Laboratory Practices and Procedures*. Springer Science+Business Media, 5: 118-161.
- Jayashree, E., Visvanathan R., John Zachariah T. (2014). Quality of dry ginger (*Zingiber officinale*) by different drying methods. *Journal of Food Science and Technology*, 51: 3190–3198.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2008). Steviol glycosides. In *Compendium of Food Additive Specifications*, 69th Meeting, FAO/WHO Monographs 5, Rome, Italy.
- Jones, R. P., e Ough, C. S. (1985). Variations in the percent ethanol (v/v) per Brix conversions of wines from different climatic regions. *American Journal of Enology and Viticultural*, 36: 268–270.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 153–156.

- Kejing, A., Dandan Z., Zhengfu W., Jijun W., Yajuan X., Gengsheng X. (2016). Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. *Food Chemistry*, 197: 1292–1300.
- Kemp, S. E., Hollwood, T., Hort, J. (2009). *Sensory Evaluation – A practical Handbook*. WileyBlackwell.
- Kilcast, D.; Subramaniam, P. (2000). Introduction. In *The stability and shelf-life of food*. CRC Press, 1: 1-19.
- Kilcast, D. and Subramanian, P. (2011). *Food and beverage stability and shelf life*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.
- Kotseridis, Y. e Baumes, R. (2000). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 400–406.
- Krebs, H.A., Wiggins, D., and Stubbs, M. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical Journal*, 214: 657–663.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier BV, London.
- Labuza, T. (2000). The search for shelf life – An update on continued efforts in understanding practical strategies for determining and testing the shelf life of food products. *Food Testing Analysis*, 5: 1-21.
- Labuza, T. P. (1985). *An integrated approach to food chemistry: Illustrative cases*. In: Food chemistry. 913–937. Fennema, O. R., Ed., Marcel Dekker Inc., New York.
- Labuza, T.P., Fu, Bin. (1997). Shelf Life Testing: Procedures and Prediction Methods. *Frozen Food Quality*, CRC Press, Denver.
- LanXESS, (2009). *Documentação interna da empresa*.
- LanXESS, (2014). *Lanxess, Tecnología Velcorin (DMDC) - una buena elección para vinos*.
- Larsen, K., Ibrahim, H., Khaw, S. H., & Saw, L. G. (1999). Gingers of Peninsular Malaysia and Singapore. *Singapore: Natural history publications* (Borneo), pp. 135.
- Lee, D. F., Swinny, E. E., & Jones, G. P. (2004). NMR identification of ethyl-linked anthocyanin-flavanol pigments formed in model wine ferments. *Tetrahedron Letters*, 45: 1671–1674.
- Leite, J. T. C., Murr, F. E. X., Park, K. J. (2005). Transições de fases em alimentos: influência no processamento e na armazenagem. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande*, 7, 1, 83-96.
- Lemus-Moncada, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132: 1121–1132.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108: 1–13.

- Lisanti, M.T., Genovese A., Piombino P., Gambuti A., Moio L. (2010). Application of an analytical method for the simultaneous determination of the off-flavour volatiles geosmin, 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol and of target wine aroma volatiles. *Italian Journal of Food Science*, 1, 22.
- Liu, M. Zeng,Z. Tian,Y. (2005). *Analytical Chemistry Acta*, 540: 341–353.
- Liu, D., Xing, RR., Li, Z., Yang D., Pan Q. (2016). Evolution of volatile compounds, aroma attributes, and sensory perception in bottle-aged red wines and their correlation. *European Food Research and Technology*, 242: 1937-1948.
- Lonvaud-Funel, A., Renouf, V. (2005). Incidence microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ou de barrique usagées. *Rev Frd'Oenol*, 211: 10–14.
- Lonvaud-Funel, A. (1995). Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters*, 126: 209–214.
- Los Angeles times* (2014). URL: <<http://articles.latimes.com/2014/feb/27/news/la-dd-french-drinking-fruit-flavored-wines-20140226>>. Consultado em 23 de Novembro de 2015.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 23–50.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*. 12<sup>th</sup> ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Manzocco, L (2012). The acceptability limit. In: *Shelf Life Assessment of Food*. CRC Press, 3: 37-58.
- Maroniac, A. e Mihali, C. (2014). Comparative color analysis of red, rosé and white wines by spectrophotometric method. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 6(1): 137-144.
- Marquez, A., Serratos, M. P., Merida, J. (2014). Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chemistry*, 146: 507–514.
- Marzarotto, V. e Barnabé, D., (2013). Sangria, cooler e coquetel de vinho. In *Bebidas alcoólicas*, Venturini, W.G., São Paulo, 449-461.
- Meeker, W. Q., & Escobar, L. A. (1998). *Statistical methods for reliability data*. New York: John Wiley & Sons.
- Moreno, J.A., Zea, A.,Moyano,L.,Medina, M. (2005).Aroma compounds as markers of the changes in sherry wine subjected to biological ageing. *Food Control*, 16: 333–338.
- Mizrahi, S. (2004).Accelerated shelf life tests. In: *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Steele, R., Ed., Cambridge,UK:Woodhead Publishing.
- Mokrzycki, W.S. e Tatol, M. (2012). Colour difference  $\Delta E^*$ - A survey. *Machine Graphics and Vision*.
- Nelson, W. (1990). Accelerated testing. *Statistical models, test plans and data analyses*. New York: John Wiley & Sons.

- Netsonda *consumer channel*, (2015). *Estudo de Mercado*. Documentação Aveleda.
- Nicoli, M. (2012). An Introduction to food shelf life: definitions, basic concepts, and regulatory aspects. Em *Shelf Life Assessment of Food*. CRC Press, 1: 1-16.
- NZFSA (2005) - New Zealand Food Safety Authority. A guide to calculating the shelf life of foods. Wellington, New Zealand, URL: <<http://www.nzfsa.govt.nz>> Consultado em Janeiro de 2016.
- Oliveira, J.M., Faria, M., Sá, F., Barros, F., Araújo, I.M., (2006). C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Analytica Chimica Acta*, 563: 300–309.
- Oliveira, J.M.; Oliveira, P.; Baumes, R.L. & Maia, M.O. (2008a). Changes in aromatic characteristics of *Loureiro* and *Alvarinho* wines during maturation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 695–707.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S. Freitas, V. Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115–1126.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (O.I.V.) (2016). Compendium of International Methods of wine and must analysis, 1, 504 pp.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (O.I.V.) (2013). Code of oenological practices (1–318). Paris: OIV Editions.
- Osborne, J. P. (2010). Advances in microbiological quality control. In: *Managing Wine Quality*, Woodhead Publishing Limited, Oregon State University, USA, 6: 162-188.
- Ough, C.S., Kunkee, R.E., Vilas, M.R., Bordeu, E., Huang, M.C. (1988). The interaction of sulfur dioxide, pH and dimethyl dicarbonate on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet and *Leuconostoc oenos* MCW. *American of Journal of Enology and Viticulture*, 39 (4): 279–282.
- Ough, CbS (1993a). 'Dimethyl dicarbonate and diethyl dicarbonate', in Davidson P. M. and Branen A. L. (eds), *Antimicrobials in Foods*, New York, Marcel Dekker, 342–368.
- Ough, C.S. (1993b). Sulfur dioxide and sulfites. In: *Antimicrobials in Foods*. P.M. Davidson and A.L. Branen (Eds.), 2<sup>nd</sup> Ed., 5: 137–190. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Pardo, I., Mendes-Ferreira, A., Ferrer, S., Faia, A.M. (2015). Controlo microbiológico de mostos e vinhos. In *Química Enológica – métodos analíticos*, Eds, Curvelo-Garcia, AS e Barros, PF. Pubindústria, 11: 425-450.
- Pérez-Magariño, S., & González-SanJosé, M. L. (2004). Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1181–1189.
- Palazón, M. A., Pérez-Conesa, D., Abellán, P., Romero, G. R. F., Vidal, M. L. (2009). Determination of shelf-life of homogenized apple-based beikost storage at different temperatures using Weibull hazard model. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 319–326.

- Pérez-Magariño, S., & González-SanJosé, M. L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96: 197–208.
- Pilone, F.J., 1953. The role of pasteurization in the sterilization and clarification of wines. *Proc. American Society Enology Davis*, 4: 77-83.
- Piper, P.W. (1999). Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 11–12.
- Porter, L.J. and Ough, C.S. (1982). *The effects of ethanol, temperature, and dimethyl dicarbonate on viability of Saccharomyces cerevisiae Montrachet No. 522 in wine*. *Am. J. Enol. Vitic.* 33: 222–225.
- Portugal, C. Sáenz, Y. Rojo-Bezares, B. Zarazaga, M. Torres, C. Cacho, J. Ruiz-Larrea, F. (2014). *Brettanomyces* susceptibility to antimicrobial agents used in winemaking: in vitro and practical approaches. *European Food Research Technology*, 238: 641–652.
- Regulamento (CE) n.º 606/2009 da Comissão de 10 de Julho de 2009 que estabelece regras de execução do Regulamento (CE) n.º 479/2008 do Conselho no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis.
- Regulamento (CE) n.º 491/2009 do conselho de 25 de Maio de 2009 que altera o Regulamento (CE) n.º 1234/2007 que estabelece uma organização comum dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas (Regulamento «OCM única»).
- Regulamento (UE) n.º 1131/2011 de 11 de novembro de 2011 que altera o Anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho no que respeita aos glicosídeos de steviol.
- Regulamento (UE) n.º 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares.
- Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios.
- Regulamento (UE) n.º 251/2014 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à definição, descrição, apresentação, rotulagem e proteção das indicações geográficas dos produtos vitivinícolas aromatizados. 26 de fevereiro de 2014.
- Renee Terrell, F., J.R. Morris, M.G. Johnson, E.E. Gbur, and D.J. Makus. (1993). Yeast inhibition in grape juice containing sulfur dioxide, sorbic acid and dimethyldicarbonate. *Journal of Food Science*, 58: 1132–1134.
- Renouf, V., Strehaiano, P., & Lonvaud-Funel, A. (2008). *Effectiveness of dimethyl dicarbonate to prevent Brettanomyces bruxellensis growth in wine*. *Food Control*, 19: 208-216.
- Ribéreau-Gayon P, Glories, Y., Maujean A., Dubordien, D. (1988). *Traité d’Oenologie 2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements* Dunod, Paris.

- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (1998). *Traité d'œnologie 2. Chimie du Vin. Stabilisation et traitements*, Ed. La Vigne-Dunod. 51-379.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology*, (2<sup>a</sup> Edição), 1 – *The Microbiology of Wine and Vinifications*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Riesen, R. (1992). Undesirable fermentation aromas. In: *Proceedings of the ASEV/ES Workshop: Wine Aroma Defects*. T. Henick-Kling (Ed.), pp. 1–43. *American Society of Enology and Viticulture* (Eastern Section), Corning, NY.
- Rodrigues, J. A. (2011). Determinação da atividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar – Qualidade Alimentar. Universidade Nova de Lisboa, 161pp.
- Romano, P. and G. Suzzi (1993). Sulphur dioxide and wine microorganisms. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G.H. Fleet (Ed.), 13: 373–393. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Ruiz, M.J, Zea, L. Moyano, L. Medina, M. (2010). *European Food Research Technology*, 230: 429–435.
- Scrimgeour, N., Nordestgaard S., Lloyd N.D.R. and Wilkes, E.N. (2015). Exploring the effect of elevated storage temperature on wine composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 713–722.
- Shanken news daily*, (2014).  
URL: <<http://www.shankennewsdaily.com/index.php/2014/05/20/9306/sangrias-surge-top-brands-up-by-43-since-2010-says-impact-databank/>> Consultado em 23 de Novembro de 2015.
- Shea, L., (2012). Introduction. In *Sangria Recipes*. 3<sup>rd</sup> Ed., Wineintro.com, 1-15.
- Shibamoto, T., and L. F. Bjeldanes. (2009). *Introduction of Food Toxicology*. 2<sup>nd</sup> Edition. T. Shibamoto and L.F. Bjeldanes (eds.). USA: Academic Press, Elsevier.
- Siebert, T.E., Smyth, H.E., Capone, D.L. *et al.* (2005). Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 381: 937.
- Singh, R.P. (1994). 'Scientific principles of shelf life evaluation'. In *Shelf Life Evaluation of Foods*, eds Man CM D and Jones JA, 3–36, London, Blackie Academic and Professional.
- Smith, J., and L. Hong-Shum (2003). *Food Additives Data Book*. J. Smith and L. Hong-Shum (eds.). Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA.
- Soejarto, D. (2002). Botany of Stevia and Stevia rebaudiana. In A. Kinghorn (Ed.), *Stevia: The genus Stevia* (18–39). London, New York: Taylor and Francis.

- Somogyi, L.P. (2006). Food Additives. In: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Eds. Hui, Y.H. CRC Taylor & Francis, 1, 1: 2-42.
- Stone, H. e Sidel, J. L. (2004). *Sensory Evaluation Practices*. 3rd Edition. Elsevier.
- Taoukis, P. S., Labuza, T. P., Saguy I. S. (1997). In Introduction, *Kinetics of Food Deterioration and Shelf-life Prediction*. CRC Press 10: 1-75.
- Thomas, D.S. and R.R. Davenport. (1985). *Zygosaccharomyces bailii*—a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology*, 2: 157–169.
- Torres, A. R., S. Lyra Wda, S. I. de Andrade, R. A. Andrade, E. C. da Silva, M. C. Araujo and N. Gaiao Eda (2011). A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid-base titration without indicator. *Talanta*, 84(3): 601-606.
- Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R. (2012). Principles and Methodologies for the Determination of Shelf–Life in Foods. *In Trends in Vital Food and Control Engineering*. InTech, 1, 3-42.
- Vilanova, M. e Oliveira, J.M. (2012). Application of Gas Chromatography on the Evaluation of Grape and Wine Aroma in Atlantic Viticulture (NW Iberian Peninsula). *In: Chromatography in Plant Science, Wine technology, Toxicology and Some Specific Applications*, 7: 109-146.
- Visti, A., Viljakainen, S., and Laakso, S. (2003). Preparation of fermentable lingonberry juice through removal of benzoic acid by *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Research International* ,36: 597–602.
- Walker, J. R. L. (1975). Enzymic browning in foods: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, Dig. 4, 89–100.
- Warth, A.D. (1985). Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. *Journal of Food Protection*, 48: 564–569.
- Weller P.J. (2006). Benzoic Acid Monograph in: R.C. Rowe, P.J. Sheskey, P. J. Weller (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th Edition, Pharmaceutical Press, 66-68.
- World Health Organization (2000). Benzoic Acid and Sodium Benzoate, Concise International Chemical Assessment Document 26, WHO, Geneva.
- Wine intelligent (2014). URL: <<http://www.wineintelligence.com/france-falls-for-flavoured-wines/>> Consultado em 23 de Novembro de 2015.
- Zach G. (2007). Alcoholic Beverages. In: *Flavourings: Production, Composition, Applications, Regulations*. Ziegler, H. (Ed.). WILEY-VCH.
- Zacharis, C. K. e Tzanavaras, P. D., (2013). Preservatives In: *Food analyses by HPLC* Nollet, L. M.L.e Toldrá, F., CRC Press, NW, 3ªEd, 15: 529-547.



## ANEXOS

ANEXO I – Tabelas de auxílio utilizadas para obter valores de parâmetros físico-químicos

ANEXO II – Fichas de Prova Sensorial Descritiva de lotes de sangria Casal Garcia

ANEXO III – Ficha de Prova de Aceitação de Sangria com glicosídeos de steviol

ANEXO IV – Exemplos de cromatogramas de sangrias do ensaio de envelhecimento



# ANEXO I – TABELAS DE AUXÍLIO UTILIZADAS PARA OBTER VALORES DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

TABELA I.1 – CORRESPONDÊNCIA DO VOLUME GASTO ( $V_{\text{gasto}}$ ) DE IODO E O VALOR DE  $\text{SO}_2$  OBTIDO (VALOR TABELADO DEVE SER MULTIPLICADO POR 1000)

$V_{\text{gasto}}$	$\text{SO}_2$												
0,1	0,003	5,9	0,151	11,7	0,3	17,5	0,448	23,3	0,596	29,1	0,745	34,9	0,893
0,2	0,005	6	0,154	11,8	0,302	17,6	0,451	23,4	0,599	29,2	0,748	35	0,896
0,3	0,008	6,1	0,156	11,9	0,305	17,7	0,453	23,5	0,602	29,3	0,75	35,1	0,899
0,4	0,01	6,2	0,159	12	0,307	17,8	0,456	23,6	0,604	29,4	0,753	35,2	0,901
0,5	0,013	6,3	0,161	12,1	0,31	17,9	0,458	23,7	0,607	29,5	0,755	35,3	0,904
0,6	0,015	6,4	0,164	12,2	0,312	18	0,461	23,8	0,609	29,6	0,758	35,4	0,906
0,7	0,018	6,5	0,166	12,3	0,315	18,1	0,463	23,9	0,612	29,7	0,76	35,5	0,909
0,8	0,02	6,6	0,169	12,4	0,317	18,2	0,466	24	0,614	29,8	0,763	35,6	0,911
0,9	0,023	6,7	0,172	12,5	0,32	18,3	0,468	24,1	0,617	29,9	0,765	35,7	0,914
1	0,026	6,8	0,174	12,6	0,323	18,4	0,471	24,2	0,62	30	0,768	35,8	0,916
1,1	0,028	6,9	0,177	12,7	0,325	18,5	0,474	24,3	0,622	30,1	0,771	35,9	0,919
1,2	0,031	7	0,179	12,8	0,328	18,6	0,476	24,4	0,625	30,2	0,773	36	0,922
1,3	0,033	7,1	0,182	12,9	0,33	18,7	0,479	24,5	0,627	30,3	0,776	36,1	0,924
1,4	0,036	7,2	0,184	13	0,333	18,8	0,481	24,6	0,63	30,4	0,778	36,2	0,927
1,5	0,038	7,3	0,187	13,1	0,335	18,9	0,484	24,7	0,632	30,5	0,781	36,3	0,929
1,6	0,041	7,4	0,189	13,2	0,338	19	0,486	24,8	0,635	30,6	0,783	36,4	0,932
1,7	0,044	7,5	0,192	13,3	0,34	19,1	0,489	24,9	0,637	30,7	0,786	36,5	0,934
1,8	0,046	7,6	0,195	13,4	0,343	19,2	0,492	25	0,64	30,8	0,788	36,6	0,937
1,9	0,049	7,7	0,197	13,5	0,346	19,3	0,494	25,1	0,643	30,9	0,791	36,7	0,94
2	0,051	7,8	0,2	13,6	0,348	19,4	0,497	25,2	0,645	31	0,794	36,8	0,942
2,1	0,054	7,9	0,202	13,7	0,351	19,5	0,499	25,3	0,648	31,1	0,796	36,9	0,945
2,2	0,056	8	0,205	13,8	0,353	19,6	0,502	25,4	0,65	31,2	0,799	37	0,947
2,3	0,059	8,1	0,207	13,9	0,356	19,7	0,504	25,5	0,653	31,3	0,801	37,1	0,95
2,4	0,061	8,2	0,21	14	0,358	19,8	0,507	25,6	0,655	31,4	0,804	37,2	0,952
2,5	0,064	8,3	0,212	14,1	0,361	19,9	0,509	25,7	0,658	31,5	0,806	37,3	0,955
2,6	0,067	8,4	0,215	14,2	0,364	20	0,512	25,8	0,66	31,6	0,809	37,4	0,957
2,7	0,069	8,5	0,218	14,3	0,366	20,1	0,515	25,9	0,663	31,7	0,812	37,5	0,96
2,8	0,072	8,6	0,22	14,4	0,369	20,2	0,517	26	0,666	31,8	0,814	37,6	0,963
2,9	0,074	8,7	0,223	14,5	0,371	20,3	0,52	26,1	0,668	31,9	0,817	37,7	0,965
3	0,077	8,8	0,225	14,6	0,374	20,4	0,522	26,2	0,671	32	0,819	37,8	0,968
3,1	0,079	8,9	0,228	14,7	0,376	20,5	0,525	26,3	0,673	32,1	0,822	37,9	0,97
3,2	0,082	9	0,23	14,8	0,379	20,6	0,527	26,4	0,676	32,2	0,824	38	0,973
3,3	0,084	9,1	0,233	14,9	0,381	20,7	0,53	26,5	0,678	32,3	0,827	38,1	0,975
3,4	0,087	9,2	0,236	15	0,384	20,8	0,532	26,6	0,681	32,4	0,829	38,2	0,978
3,5	0,09	9,3	0,238	15,1	0,387	20,9	0,535	26,7	0,684	32,5	0,832	38,3	0,98
3,6	0,092	9,4	0,241	15,2	0,389	21	0,538	26,8	0,686	32,6	0,835	38,4	0,983
3,7	0,095	9,5	0,243	15,3	0,392	21,1	0,54	26,9	0,689	32,7	0,837	38,5	0,986
3,8	0,097	9,6	0,246	15,4	0,394	21,2	0,543	27	0,691	32,8	0,84	38,6	0,988
3,9	0,1	9,7	0,248	15,5	0,397	21,3	0,545	27,1	0,694	32,9	0,842	38,7	0,991
4	0,102	9,8	0,251	15,6	0,399	21,4	0,548	27,2	0,696	33	0,845	38,8	0,993
4,1	0,105	9,9	0,253	15,7	0,402	21,5	0,55	27,3	0,699	33,1	0,847	38,9	0,996
4,2	0,108	10	0,256	15,8	0,404	21,6	0,553	27,4	0,701	33,2	0,85	39	0,998
4,3	0,11	10,1	0,259	15,9	0,407	21,7	0,556	27,5	0,704	33,3	0,852	39,1	1,001
4,4	0,113	10,2	0,261	16	0,41	21,8	0,558	27,6	0,707	33,4	0,855	39,2	1,004
4,5	0,115	10,3	0,264	16,1	0,412	21,9	0,561	27,7	0,709	33,5	0,858	39,3	1,006
4,6	0,118	10,4	0,266	16,2	0,415	22	0,563	27,8	0,712	33,6	0,86	39,4	1,009
4,7	0,12	10,5	0,269	16,3	0,417	22,1	0,566	27,9	0,714	33,7	0,863	39,5	1,011
4,8	0,123	10,6	0,271	16,4	0,42	22,2	0,568	28	0,717	33,8	0,865	39,6	1,014
4,9	0,125	10,7	0,274	16,5	0,422	22,3	0,571	28,1	0,719	33,9	0,868	39,7	1,016
5	0,128	10,8	0,276	16,6	0,425	22,4	0,573	28,2	0,722	34	0,87	39,8	1,019
5,1	0,131	10,9	0,279	16,7	0,428	22,5	0,576	28,3	0,724	34,1	0,873	39,9	1,021
5,2	0,133	11	0,282	16,8	0,43	22,6	0,579	28,4	0,727	34,2	0,876	40	1,024
5,3	0,136	11,1	0,284	16,9	0,433	22,7	0,581	28,5	0,73	34,3	0,878	40,1	1,027
5,4	0,138	11,2	0,287	17	0,435	22,8	0,584	28,6	0,732	34,4	0,881	40,2	1,029

TABELA I.1 – CORRESPONDÊNCIA DO VOLUME GASTO ( $V_{\text{gasto}}$ ) DE IODO E O VALOR DE SO<sub>2</sub> OBTIDO (VALOR TABELADO DEVE SER MULTIPLICADO POR 1000) (CONT.)

5,5	0,141	11,3	0,289	17,1	0,438	22,9	0,586	28,7	0,735	34,5	0,883	40,3	1,032
5,6	0,143	11,4	0,292	17,2	0,44	23	0,589	28,8	0,737	34,6	0,886	40,4	1,034
5,7	0,146	11,5	0,294	17,3	0,443	23,1	0,591	28,9	0,74	34,7	0,888	40,5	1,037
5,8	0,148	11,6	0,297	17,4	0,445	23,2	0,594	29	0,742	34,8	0,891	40,6	1,039
40,7	1,042	46,5	1,190	52,3	1,339	58,1	1,487	63,9	1,636	69,7	1,784	75,5	1,933
40,8	1,044	46,6	1,193	52,4	1,341	58,2	1,490	64,0	1,638	69,8	1,787	75,6	1,935
40,9	1,047	46,7	1,196	52,5	1,344	58,3	1,492	64,1	1,641	69,9	1,789	75,7	1,938
41,0	1,050	46,8	1,198	52,6	1,347	58,4	1,495	64,2	1,644	70,0	1,792	75,8	1,940
41,1	1,052	46,9	1,201	52,7	1,349	58,5	1,498	64,3	1,646	70,1	1,795	75,9	1,943
41,2	1,055	47,0	1,203	52,8	1,352	58,6	1,500	64,4	1,649	70,2	1,797	76,0	1,946
41,3	1,057	47,1	1,206	52,9	1,354	58,7	1,503	64,5	1,651	70,3	1,800	76,1	1,948
41,4	1,060	47,2	1,208	53,0	1,357	58,8	1,505	64,6	1,654	70,4	1,802	76,2	1,951
41,5	1,062	47,3	1,211	53,1	1,359	58,9	1,508	64,7	1,656	70,5	1,805	76,3	1,953
41,6	1,065	47,4	1,213	53,2	1,362	59,0	1,510	64,8	1,659	70,6	1,807	76,4	1,956
41,7	1,068	47,5	1,216	53,3	1,364	59,1	1,513	64,9	1,661	70,7	1,810	76,5	1,958
41,8	1,070	47,6	1,219	53,4	1,367	59,2	1,516	65,0	1,664	70,8	1,812	76,6	1,961
41,9	1,073	47,7	1,221	53,5	1,370	59,3	1,518	65,1	1,667	70,9	1,815	76,7	1,964
42,0	1,075	47,8	1,224	53,6	1,372	59,4	1,521	65,2	1,669	71,0	1,818	76,8	1,966
42,1	1,078	47,9	1,226	53,7	1,375	59,5	1,523	65,3	1,672	71,1	1,820	76,9	1,969
42,2	1,080	48,0	1,229	53,8	1,377	59,6	1,526	65,4	1,674	71,2	1,823	77,0	1,971
42,3	1,083	48,1	1,231	53,9	1,380	59,7	1,528	65,5	1,677	71,3	1,825	77,1	1,974
42,4	1,085	48,2	1,234	54,0	1,382	59,8	1,531	65,6	1,679	71,4	1,828	77,2	1,976
42,5	1,088	48,3	1,236	54,1	1,385	59,9	1,533	65,7	1,682	71,5	1,830	77,3	1,979
42,6	1,091	48,4	1,239	54,2	1,388	60,0	1,536	65,8	1,684	71,6	1,833	77,4	1,981
42,7	1,093	48,5	1,242	54,3	1,390	60,1	1,539	65,9	1,687	71,7	1,836	77,5	1,984
42,8	1,096	48,6	1,244	54,4	1,393	60,2	1,541	66,0	1,690	71,8	1,838	77,6	1,987
42,9	1,098	48,7	1,247	54,5	1,395	60,3	1,544	66,1	1,692	71,9	1,841	77,7	1,989
43,0	1,101	48,8	1,249	54,6	1,398	60,4	1,546	66,2	1,695	72,0	1,843	77,8	1,992
43,1	1,103	48,9	1,252	54,7	1,400	60,5	1,549	66,3	1,697	72,1	1,846	77,9	1,994
43,2	1,106	49,0	1,254	54,8	1,403	60,6	1,551	66,4	1,700	72,2	1,848	78,0	1,997
43,3	1,108	49,1	1,257	54,9	1,405	60,7	1,554	66,5	1,702	72,3	1,851	78,1	1,999
43,4	1,111	49,2	1,260	55,0	1,408	60,8	1,556	66,6	1,705	72,4	1,853	78,2	2,002
43,5	1,114	49,3	1,262	55,1	1,411	60,9	1,559	66,7	1,708	72,5	1,856	78,3	2,004
43,6	1,116	49,4	1,265	55,2	1,413	61,0	1,562	66,8	1,710	72,6	1,859	78,4	2,007
43,7	1,119	49,5	1,267	55,3	1,416	61,1	1,564	66,9	1,713	72,7	1,861	78,5	2,010
43,8	1,121	49,6	1,270	55,4	1,418	61,2	1,567	67,0	1,715	72,8	1,864	78,6	2,012
43,9	1,124	49,7	1,272	55,5	1,421	61,3	1,569	67,1	1,718	72,9	1,866	78,7	2,015
44,0	1,126	49,8	1,275	55,6	1,423	61,4	1,572	67,2	1,720	73,0	1,869	78,8	2,017
44,1	1,129	49,9	1,277	55,7	1,426	61,5	1,574	67,3	1,723	73,1	1,871	78,9	2,020
44,2	1,132	50,0	1,280	55,8	1,428	61,6	1,577	67,4	1,725	73,2	1,874	79,0	2,022
44,3	1,134	50,1	1,283	55,9	1,431	61,7	1,580	67,5	1,728	73,3	1,876	79,1	2,025
44,4	1,137	50,2	1,285	56,0	1,434	61,8	1,582	67,6	1,731	73,4	1,879	79,2	2,028
44,5	1,139	50,3	1,288	56,1	1,436	61,9	1,585	67,7	1,733	73,5	1,882	79,3	2,030
44,6	1,142	50,4	1,290	56,2	1,439	62,0	1,587	67,8	1,736	73,6	1,884	79,4	2,033
44,7	1,144	50,5	1,293	56,3	1,441	62,1	1,590	67,9	1,738	73,7	1,887	79,5	2,035
44,8	1,147	50,6	1,295	56,4	1,444	62,2	1,592	68,0	1,741	73,8	1,889	79,6	2,038
44,9	1,149	50,7	1,298	56,5	1,446	62,3	1,595	68,1	1,743	73,9	1,892	79,7	2,040
45,0	1,152	50,8	1,300	56,6	1,449	62,4	1,597	68,2	1,746	74,0	1,894	79,8	2,043
45,1	1,155	50,9	1,303	56,7	1,452	62,5	1,600	68,3	1,748	74,1	1,897	79,9	2,045
45,2	1,157	51,0	1,306	56,8	1,454	62,6	1,603	68,4	1,751	74,2	1,900	80,0	2,048
45,3	1,160	51,1	1,308	56,9	1,457	62,7	1,605	68,5	1,754	74,3	1,902	80,1	2,051
45,4	1,162	51,2	1,311	57,0	1,459	62,8	1,608	68,6	1,756	74,4	1,905	80,2	2,053
45,5	1,165	51,3	1,313	57,1	1,462	62,9	1,610	68,7	1,759	74,5	1,907	80,3	2,056
45,6	1,167	51,4	1,316	57,2	1,464	63,0	1,613	68,8	1,761	74,6	1,910	80,4	2,058
45,7	1,170	51,5	1,318	57,3	1,467	63,1	1,615	68,9	1,764	74,7	1,912	80,5	2,061
45,8	1,172	51,6	1,321	57,4	1,469	63,2	1,618	69,0	1,766	74,8	1,915	80,6	2,063
45,9	1,175	51,7	1,324	57,5	1,472	63,3	1,620	69,1	1,769	74,9	1,917	80,7	2,066
46,0	1,178	51,8	1,326	57,6	1,475	63,4	1,623	69,2	1,772	75,0	1,920	80,8	2,068
46,1	1,180	51,9	1,329	57,7	1,477	63,5	1,626	69,3	1,774	75,1	1,923	80,9	2,071
46,2	1,183	52,0	1,331	57,8	1,480	63,6	1,628	69,4	1,777	75,2	1,925	81,0	2,074
46,3	1,185	52,1	1,334	57,9	1,482	63,7	1,631	69,5	1,779	75,3	1,928	81,1	2,076
46,4	1,188	52,2	1,336	58,0	1,485	63,8	1,633	69,6	1,782	75,4	1,930	81,2	2,079

Tabela I.2 – Correspondência entre a diferença de volumes gastos na titulação ( $\Delta V = n' - n$ ) e a massa de substâncias redutoras ( $SR_m$ ) presentes na solução

$\Delta V_{Na_2S_2O_3}$	$SR_m$								
mL	mg								
1,0	2,40	6,0	14,70	11,0	27,61	16,0	41,31	21,0	56,01
1,1	2,64	6,1	14,95	11,1	27,88	16,1	41,60	21,1	56,32
1,2	2,88	6,2	15,20	11,2	28,15	16,2	41,89	21,2	56,63
1,3	3,12	6,3	15,45	11,3	28,42	16,3	42,18	21,3	56,94
1,4	3,36	6,4	15,70	11,4	28,69	16,4	42,47	21,4	57,25
1,5	3,60	6,5	15,95	11,5	28,96	16,5	42,76	21,5	57,56
1,6	3,84	6,6	16,20	11,6	29,23	16,6	43,05	21,6	57,87
1,7	4,08	6,7	16,45	11,7	29,50	16,7	43,34	21,7	58,18
1,8	4,32	6,8	16,70	11,8	29,77	16,8	43,63	21,8	58,49
1,9	4,56	6,9	16,95	11,9	30,04	16,9	43,92	21,9	58,80
2,0	4,80	7,0	17,20	12,0	30,31	17,0	44,21	22,0	59,11
2,1	5,04	7,1	17,46	12,1	30,58	17,1	44,50	22,1	59,42
2,2	5,28	7,2	17,72	12,2	30,85	17,2	44,79	22,2	59,73
2,3	5,52	7,3	17,98	12,3	31,12	17,3	45,08	22,3	60,04
2,4	5,76	7,4	18,24	12,4	31,39	17,4	45,37	22,4	60,35
2,5	6,00	7,5	18,50	12,5	31,66	17,5	45,66	22,5	60,66
2,6	6,24	7,6	18,76	12,6	31,93	17,6	45,95	22,6	60,97
2,7	6,48	7,7	19,02	12,7	32,20	17,7	46,24	22,7	61,28
2,8	6,72	7,8	19,28	12,8	32,47	17,8	46,53	22,8	61,59
2,9	6,96	7,9	19,54	12,9	32,74	17,9	46,82	22,9	61,90
3,0	7,20	8,0	19,80	13,0	33,01	18,0	47,11	23,0	62,21
3,1	7,45	8,1	20,06	13,1	33,28	18,1	47,40		
3,2	7,70	8,2	20,32	13,2	33,55	18,2	47,69		
3,3	7,95	8,3	20,58	13,3	33,82	18,3	47,98		
3,4	8,20	8,4	20,84	13,4	34,09	18,4	48,27		
3,5	8,45	8,5	21,10	13,5	34,36	18,5	48,56		
3,6	8,70	8,6	21,36	13,6	34,63	18,6	48,85		
3,7	8,95	8,7	21,62	13,7	34,90	18,7	49,14		
3,8	9,20	8,8	21,88	13,8	35,17	18,8	49,43		
3,9	9,45	8,9	22,14	13,9	35,44	18,9	49,72		
4,0	9,70	9,0	22,40	14,0	35,71	19,0	50,01		
4,1	9,95	9,1	22,66	14,1	35,99	19,1	50,31		
4,2	10,20	9,2	22,92	14,2	36,27	19,2	50,61		
4,3	10,45	9,3	23,18	14,3	36,55	19,3	50,91		
4,4	10,75	9,4	23,44	14,4	36,83	19,4	51,21		
4,5	10,95	9,5	23,70	14,5	37,11	19,5	51,51		
4,6	11,20	9,6	23,96	14,6	37,39	19,6	51,81		
4,7	11,45	9,7	24,22	14,7	37,67	19,7	52,11		
4,8	11,70	9,8	24,48	14,8	37,95	19,8	52,41		
4,9	11,95	9,9	24,74	14,9	38,23	19,9	52,71		
5,0	12,20	10,0	25,00	15,0	38,51	20,0	53,01		
5,1	12,45	10,1	25,26	15,1	38,79	20,1	53,31		
5,2	12,70	10,2	25,52	15,2	39,07	20,2	53,61		
5,3	12,95	10,3	25,78	15,3	39,35	20,3	53,91		
5,4	13,20	10,4	26,04	15,4	39,63	20,4	54,21		
5,5	13,45	10,5	26,30	15,5	39,91	20,5	54,51		
5,6	13,70	10,6	26,56	15,6	40,19	20,6	54,81		
5,7	13,95	10,7	26,82	15,7	40,47	20,7	55,11		
5,8	14,20	10,8	27,08	15,8	40,75	20,8	55,41		
5,9	14,45	10,9	27,34	15,9	41,03	20,9	55,71		

## ANEXO II – FICHAS DE PROVA SENSORIAL DESCRITIVA DE LOTES DE SANGRIA CASAL GARCIA

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Avalie segundo a escala seguinte:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ausente	Extremamente fraco	Muito fraco	Fraco	Moderado	Ligeiramente forte	Forte	Muito forte	Extremamente forte

Amostra					
Visual (Cor)	Intensidade				
	Aspeto/Limpidez				
	Evolução (amarelado/acastanhado)				
Olfativo (Aroma)	Intensidade				
	Persistência/Consistência				
	Frutado				
	Especiarias				
	Floral				
	Odor desagradável				
Gustativo (Sabor)	Complexidade				
	Intensidade				
	Frutado				
	Especiarias				
	<i>Off-flavour</i>				
	Acidez				
	Doçura				
	Adstringência				
	Amargor				
	Álcool/Calor				
	Estrutura/Corpo				
	Frescura				
	Equilíbrio				
	Fim de boca				
	Diluição				
Presença de gás					
<b>Apreciação global (0-20)</b>					

Se, em alguma amostra conseguiu detetar algum (s) aroma (s) em específico, indique-os com uma (x), por favor, no seguinte quadro:

		Amostras			
Aromas					
<b>Frutados</b>	F. Vermelhos				
	Maçã				
	Laranja				
	Limão				
	Lima				
	Kiwi				
	Frutos tropicais				
	Melão				
	Frutos de caroço				
	Pêra				
	Fruta em passa				
	Banana				
<b>Especiarias</b>	Canela				
	Hortelã				
<b>Off-flavour</b>	"Suor de Cavalo"				
	Gerânio (folha de sardineira)				
	Odor a "cola" (acetato de etilo)				
	Diacetil (amanteigado e/ou rançoso)				
	Cozido				
	Acetaldeído				
	Picante				
	Metional (batata crua, couve flor)				
<b>Outros aromas</b>	Caramelo				
	Chocolate				
	Frutos secos				
	Feno				
	Resina				
	Mel				
	Erva/Vegetal				
	Fumado				
	Confeitaria				

Tabela II.1 – Tabela com definição de alguns descritores avaliados na prova sensorial dos lotes de sangria Casal Garcia

Descritor	Definição
<b>Acastanhada</b>	Termo usado para definir a cor de vinhos velhos e oxidados.
<b>Acetaldeído</b>	Provém da oxidação do álcool num vinho que sofreu arejamento mais ou menos forte. Lembra fruto macerado, arejado, esmagado e abandonado.
<b>Acetato de etilo</b>	Éster produzido no ataque de bactérias acéticas ao álcool do vinho. Tem um cheiro a cola e a acetona e um gosto ardente e picante desagradável (Ascência).
<b>Adstringência</b>	Sensação provocada pela coagulação das proteínas da saliva por ação dos taninos do vinho. Sensação de língua áspera.
<b>Complexidade</b>	Vinho com um aroma e sabor ricos, intensos e diversos.
<b>Consistência</b>	Vinho firme com alguma matéria mas fundamentalmente muito equilibrado.
<b>Corpo/Estrutura</b>	Untuosidade, vinosidade, amplitude de boca de um vinho. Quanto maior a amplitude de boca, mais encorpado é o vinho.
<b>Equilíbrio</b>	Qualidade essencial de um vinho. Mostra harmonia entre todos os componentes aromáticos e gustativos. Um vinho desequilibrado pode ser ácido, taninoso, áspero, alcoólico.
<b>Diacetil</b>	Produção da oxidação da acetona. Nos vinhos tem aroma a manteiga rançosa.
<b>Feno</b>	Aroma vegetal que recorda o da erva seca, surge em vinhos tintos com alguma evolução.
<b>Fim de boca</b>	Conjunto e intensidade de sensações que o vinho deixa na boca depois de ser engolido ou cuspidado.
<b>Floral</b>	Vinho com aroma a flores (rosa, violeta, tília, jasmim, laranja...)
<b>Frescura</b>	Vinho com agradável e viva acidez frutada.
<b>Frutado</b>	Vinho com aroma e sabor intenso a fruto (s).
<b>Frutos secos</b>	Família de aromas que recorda os frutos secos (nozes, avelãs, amêndoas, pistácio..)
<b>Frutos tropicais</b>	Aromas dos frutos de manga, ananás, abacaxi, maracujá..)
<b>Frutos vermelhos</b>	Aromas de certos vinhos tintos que recorda as bagas vermelhas do bosque (framboesas, morangos, groselhas, amora), ou de ginja e cerejas maduras.
<b>Cozido</b>	Aroma sem frescura, cansado, estufado, prova magra, sem corpo e carácter.
<b>Frutos em passa</b>	Aroma dos frutos em passa, ameixa, alperce, figo, cereja.
<b>Diluição</b>	Diz-se de um vinho com pouco aroma e sabor. Que lembra a água.
<b>Frutos de caroço</b>	Aromas dos frutos de pêssigo, alperce, nectarina, ameixa,...
<b>Fumado</b>	Diz-se de um vinho que recorda o aroma agradável de madeira tostada.
<b>Confeitaria</b>	Aroma que recorda os frutos confeitados, o bolo de frutos secos e em passa, o caramelo.

### ANEXO III – FICHA DE PROVA DE ACEITAÇÃO DE SANGRIA COM GLICOSÍDEOS DE STEVIOL

NOME \_\_\_\_\_ DATA \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Caro provador,

Tem na sua presença 1 amostra de sangria para avaliar quanto à sua aceitabilidade.

- Extremamente agradável
- Muito agradável
- Agradável
- Ligeiramente agradável
- Indiferente
- Ligeiramente desagradável
- Desagradável
- Muito desagradável
- Extremamente desagradável

#### Intenção de Compra

- Compraria definitivamente
- Provavelmente compraria
- Talvez comprasse/Talvez não
- Provavelmente não compraria
- Não compraria definitivamente

Observações (Refira o que mais gostou e o que menos gostou na amostra de sangria):

---

Obrigado pela sua participação!

## ANEXO IV – EXEMPLOS DE CROMATOGRAMAS DAS SANGRIAS DO ENSAIO DE ENVELHECIMENTO

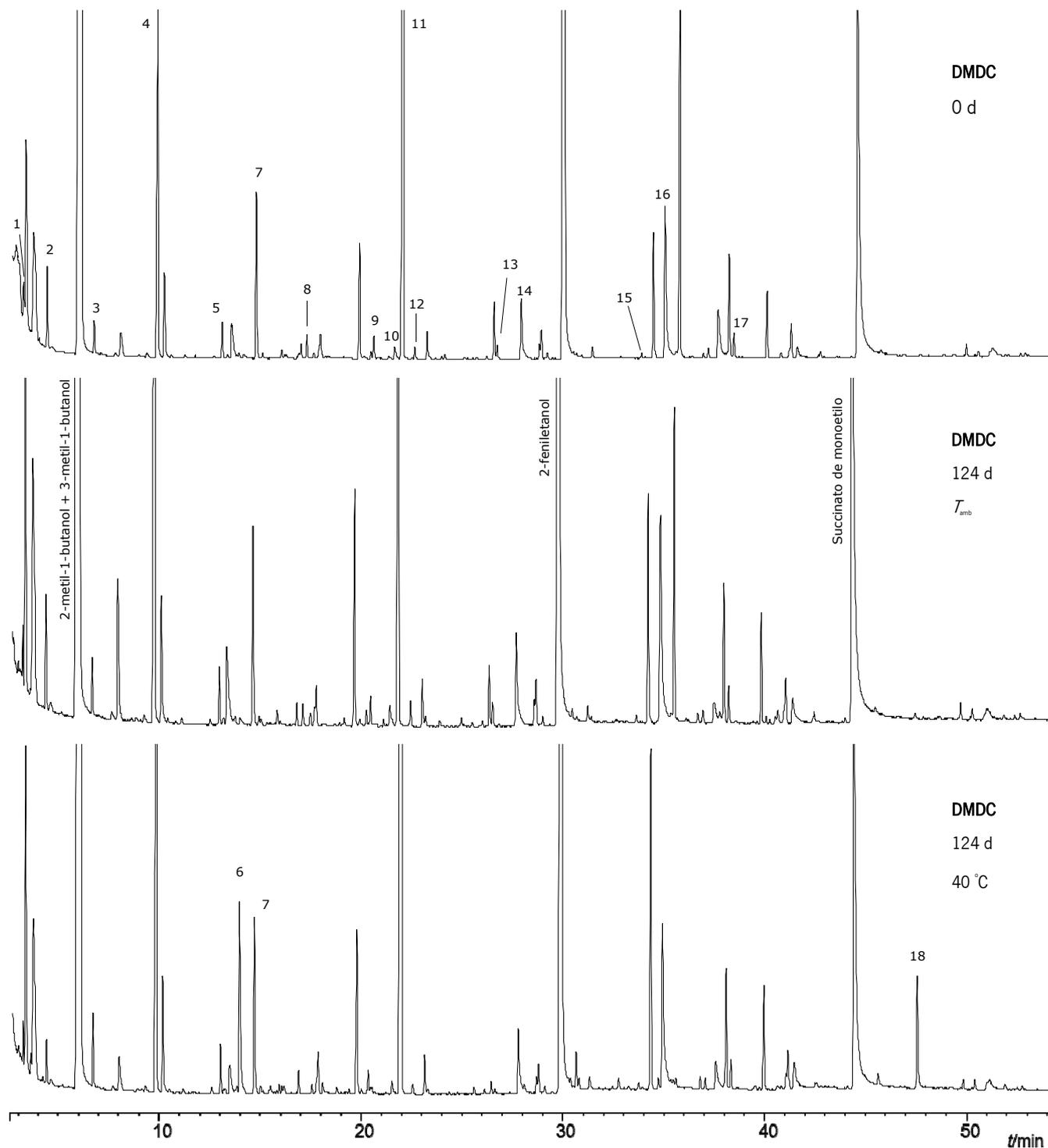


Figura IV.1 – (1) butirato de etilo; (2) acetato de 3-metil-1-butilo; (3) hexanoato de etilo; (4) lactato de etilo; (5) octanoato de etilo; (6) furfural; (7) 4-nonanol, padrão interno; (8) linalol; (9) decanoato de etilo; (10) ácido 2-metilbutírico+3-metilbutírico; (11) succinato de dietilo; (12)  $\alpha$ -terpineol; (13) acetato de 2-feniletilo; (14) ácido hexanóico; (15) 4-etilguaicol; (16) ácido octanóico; (17) 4-vinilguaicol; (18) 5-hidroxiacetilfurfural.

