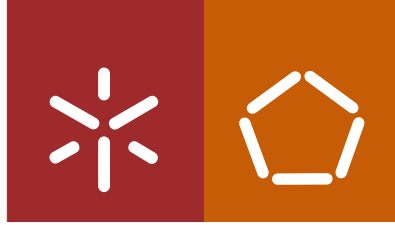




Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Flávio Rodrigues Margato

Estabilidade Microbiológica em Sangrias



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Flávio Rodrigues Margato

Estabilidade Microbiológica em Sangrias

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor José Maria Oliveira
do
Enólogo Manuel Soares
e da
Engenheira Susete Rodrigues

outubro de 2019

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

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

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho teve o apoio de algumas pessoas sem as quais seria impossível a sua realização e a superação de todas as dificuldades e dúvidas que surgiram durante os cerca de 9 meses de estágio.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Universidade do Minho, à Aveleda S.A., à Professora Lígia Rodrigues e ao Enólogo Manuel Soares a possibilidade de realização do estágio curricular numa empresa vitivinícola nacional de topo.

Ao Professor Doutor José Maria Oliveira pela orientação, atenção e apoio que me deu ao longo do ano letivo de forma a executar e a finalizar este trabalho.

À Engenheira Susete Rodrigues não só por me integrar na empresa, me ajudar e me orientar ao longo de todo o estágio, de forma a poder concretizar este trabalho, mas também pelos ensinamentos práticos de laboratório e pelas lições relativas a interações sociais com os colegas de trabalho que me permitiram evoluir num ambiente profissional.

A toda a restante equipa do departamento de enologia da Aveleda (Maria do Carmo, Carla, Patrícia, Engenheiro Rui Viana) pelo que me ensinaram e pela ajuda que me deram ao longo do estágio.

Novamente, a toda a equipa do departamento de enologia, aos colaboradores da logística (Carlos, Elizabete, Susete, Tiago, Carlos Alberto, Moura e o Sr. João) e à estagiária Joana pelo excelente ambiente familiar e bons momentos de convívio que proporcionaram.

A todos os colaboradores da adega e rede de frio (Sr. Adão, João, Rui, Carlos, Manuel, Luís, Marco, Miguel e Francisco) pelos ensinamentos do trabalho prático que são necessários numa adega e pela boa disposição e brincadeiras.

Ao Sr. Gil da contabilidade sem o qual a minha rotina seria muito mais difícil durante o estágio e também à Delfina pelo bom convívio diário.

Ao Henrique e à minha mãe que me proporcionaram a vida que tive até agora, me apoiaram sempre nos estudos e, principalmente, deram-me uma educação da qual eu tenho muito orgulho.

E, por fim, um agradecimento à Rita que muito me compreendeu, apoiou e ajudou, durante os momentos mais difíceis deste último ano, e fez de mim a pessoa que sou hoje.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo – Estabilidade microbiológica em sangrias

A sangria, tal como o vinho, é um produto vitivinícola microbiologicamente seguro, devido à sua acidez e teor alcoólico que impedem o crescimento de microrganismos nocivos para a saúde humana. No entanto, é um produto cujas características organolépticas podem deteriorar-se ao longo do tempo com a atividade de determinados microrganismos que contaminam as uvas, mosto, vinho e sangria, produzindo compostos que alteram cor, aroma ou sabor. Para evitar o decréscimo de qualidade dos produtos vitivinícolas e prolongar o seu tempo de prateleira são usados conservantes antioxidantes e inibidores do crescimento microbiano. Assim, este estudo teve como principal objetivo a determinação da estabilidade microbiológica de sangrias brancas e de frutos vermelhos, cuja constituição continha, para além de SO_2 , ácido sórbico e/ou dicarbonato de dimetilo (DMDC), dois conservantes usados na indústria vitivinícola.

A parte fundamental do trabalho consistiu em exames microbiológicos realizados em amostras de sangrias brancas e de frutos vermelhos com o objetivo de quantificar a carga e a diversidade microbiana presente nestes produtos. Foram analisadas sangrias brancas com ácido sórbico, sangrias brancas com ácido sórbico e DMDC e sangrias de frutos vermelhos com ácido sórbico na sua constituição.

A partir deste estudo foi possível concluir que a sangria de frutos vermelhos é microbiologicamente estável apenas com a aplicação do ácido sórbico e que a sangria branca com ácido sórbico e DMDC é microbiologicamente estável com a aplicação destes dois conservantes. Por comparação dos resultados dos dois conjuntos de amostras de sangrias brancas, verificou-se que o uso da combinação dos dois conservantes é mais eficaz do que apenas o uso de ácido sórbico, dado o crescimento de leveduras nas sangrias tratadas apenas com este conservante.

Palavras-chave

Ácido sórbico; Dicarbonato de dimetilo (DMDC); Estabilidade microbiológica; Sangria

Abstract – Microbiological stability in sangrias

Sangria, like wine, it's a microbiological safe wine product due to its acidity and alcohol content that prevent the growth of microorganisms harmful to human health. However, it's a product whose organoleptic characteristics can deteriorate over time with the activity of specific microorganisms that contaminate grapes, must, wine and sangria, producing compounds that alter color, aroma or flavour. In order to avoid quality decay of wine products and extend its shelf time, antioxidative preservatives and microbial inhibitors growth are used. The main goal of this study was the determination of microbiological stability of white and red fruits sangrias, whose constitution contained, beyond SO₂, sorbic acid and/or dimethyl decarbonate (DMDC), which are two preservatives used in wine industry.

The core of the work consisted in microbiological exams performed in white and red fruits sangrias samples with the goal to quantify the microbial load and diversity in these products. White sangrias with sorbic acid, white sangrias with sorbic acid and DMDC and red fruits sangrias with sorbic acid were analysed.

This study allowed the conclusion that the red fruits sangria with just sorbic acid as a preservative is microbiological stable and that the white sangria with sorbic acid and DMDC is microbiological stable. By comparison of the results from the two sets of samples of white sangrias and given the yeast growth in the sangrias treated with just sorbic acid, it was found that the use of the both preservatives combined is more effective than the use of this preservative.

Keywords

Dimethyl dicarbonate (DMDC); Microbiological stability; Sangria; Sorbic Acid

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo – Estabilidade microbiológica em sangrias.....	v
Abstract – Microbiological stability in sangrias	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	x
Siglas e abreviaturas.....	xi
Variáveis.....	xi
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento e objetivos	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Sangria como produto derivado do vinho	3
2.1.1. Vinho	3
2.1.2. Sangria	4
2.2. Microbiologia do vinho e da sangria.....	5
2.2.1. Diversidade e dinâmica microbiológica.....	5
2.2.2. Contaminações microbiológicas nos vinhos e sangrias	8
2.2.3. Estabilidade microbiológica.....	12
2.3. Preservação do vinho e sangria	13
2.3.1. Dióxido de enxofre	14
2.3.2. Sorbato de potássio/ácido sórbico	15
2.3.3. DMDC	16
2.3.4. Microfiltração	17
2.3.5. Outros métodos de preservação.....	17
2.4. Métodos de análise microbiológica	19
2.4.1.1. Identificação de microrganismos.....	19
2.4.1.2. Contagem de microrganismos	20
3. Materiais e métodos	23
3.1. Planeamento experimental	24
3.2. Análises microbiológicas	27
3.2.1. Exame microscópico de líquidos e depósitos.....	27
3.2.2. Contagem de microrganismos em meio de cultura.....	28

3.3.	Análise do ácido sórbico.....	28
3.3.1.	Determinação da concentração do ácido sórbico por HPLC	29
3.3.2.	Determinação da concentração do ácido sórbico por espectrofotometria	29
4.	Resultados e discussão	31
4.1.	Análises microbiológicas	31
4.1.1.	Exame microscópico de líquidos e depósitos	31
4.1.2.	Contagem de microrganismos em meio de cultura.....	33
4.2.	Análises químicas	36
4.2.1.	Concentração do ácido sórbico	36
5.	Conclusões e perspectivas de trabalho	38
	Referências bibliográficas	40
	Anexos	43
	Anexo I – Exemplos de boletins dos resultados dos exames microbiológicos	44
	Anexo II – Boletins dos resultados das concentrações de ácido sórbico, por HPLC.....	47
	Anexo III – Exemplo de cálculo da determinação da concentração do ácido sórbico por espectrofotometria	49

Índice de figuras

Figura 1. Residência da família Guedes, na Quinta da Aveleda.	2
Figura 2. Fungos filamentosos que colonizam a superfície dos bagos: A) <i>Alternaria</i> , B) <i>Penicillium</i> , C) <i>Botrytis</i>	6
Figura 3. Leveduras presentes no vinho: A) que levam à fermentação alcoólica, como <i>S. cerevisiae</i> , B), C), D) e que podem levar a defeitos organoléticos, como <i>Z. bailii</i> , <i>S. ludwigii</i> e <i>B. bruxellensis</i> , respetivamente.	10
Figura 4. Modo de ação do DMDC em microrganismos.	16
Figura 5. Amostras SB+AS+DMDC e SVF+AS armazenadas à temperatura ambiente, na sala de amostras da Aveleda S.A. (esquerda) e amostras SB+AS+DMDC e SVF+AS armazenadas a 45 °C, na estufa.	25
Figura 6. Organograma do planeamento experimental.	26
Figura 7. Aparelho Cazenave-Ferré onde foi efetuada a destilação de sangria branca para a extração do ácido sórbico (A). Espectrofotómetro Jasco V-530 de radiação visível e ultravioleta (B).	30
Figura 8. Número médio de bactérias com forma de bastonete, leveduras isoladas e formas curtas suspeitas nas amostras SB+AS-20.	32
Figura 9. Número médio de bactérias com forma de bastonete, leveduras isoladas e formas curtas suspeitas nas amostras SB+AS-45.	33
Figura 10. Número médio de bactérias com forma de bastonete, leveduras isoladas e formas curtas suspeitas nas amostras SB+AS+DMDC-20 (A), SB+AS+DMDC-45 (B), SFV+AS-20 (C) e SFV+AS-45 (D).	34
Figura I.1. Boletim do resultado microbiológica duma amostra SB+AS-20- t_5	44
Figura I.2. Boletim do resultado microbiológico da amostra SB+AS+DMDC-45- t_6	45
Figura I.3. Boletim do resultado microbiológico da amostra SFV+AS- t_0	46
Figura II.1. Boletim do resultado HPLC para a determinação da concentração de ácido sórbico nas amostras SB+AS.	47
Figura II.2. Boletim do resultado HPLC para a determinação da concentração de ácido sórbico nas amostras SB+AS.	48

Índice de tabelas

Tabela 1. Caracterização físico-química das sangrias branca (SB) e de frutos vermelhos (SFV) em produto não acabado.....	23
Tabela 2. Caracterização físico-química das sangrias branca (SB) e de frutos vermelhos (SFV) em produto acabado.	23
Tabela 3. Resultados do crescimento microbiológico, em número de UFC, em 100 mL, salvo exceções, em todos os tempos de análise. As amostras t0 são as mesmas nas diferentes temperaturas (20 °C e 45 °C). a – Número de UFC em 50 mL.....	37
Tabela III.1. Valores de absorvância a 256 nm (A_{S256}), concentração (C) final, com aplicação do fator de diluição de 1000. Valores obtidos através da Equação 1.....	49

Siglas e abreviaturas

AS – Ácido sórbico

BAC – Bactérias do ácido acético

BAL – Bactérias do ácido láctico

DMDC – Dicarbonato de dimetilo

et al. – E outros, do latim *et alli*

SB – Sangria branca

SFV – Sangria de frutos vermelhos

Variáveis

AT – Acidez total, como ácido tartárico

AV – Acidez volátil, como ácido acético

$C_{açúc}$ – Concentração de açúcares

C_{CO_2} – Concentração de CO_2

C_{O_2} – Concentração de O_2

$C_{SO_2 \text{ livre}}$ – Concentração de SO_2 livre

$C_{SO_2 \text{ total}}$ – Concentração de SO_2 total

MV – Massa volúmica

N – Número de microrganismos

t_x – Tempo de armazenamento, em que x é o número de meses

TAV – Título alcoométrico volúmico

UFC – Unidades formadoras de colónias

1. Introdução

1.1. Enquadramento e objetivos

Nos dias de hoje, o setor alimentar encontra-se em constante desenvolvimento tecnológico, não obstante das tendências comerciais, e sempre atento às preferências do consumidor. O setor dos vinhos não é exceção. Daí, as empresas vitivinícolas de topo, como a Aveleda S.A., apostarem na inovação, quer a nível de produtos, quer a nível de processos e de gestão de recursos.

O Grupo Aveleda é detido pela mesma família, a família Guedes, há já 5 gerações. Este Grupo está presente em 4 regiões vitivinícolas portuguesas (Vinhos Verdes, Douro, Bairrada e Algarve) e é o maior produtor e exportador de Vinho Verde em Portugal, exportando para mais de 70 países em todo o mundo. A empresa não só é detentora de várias marcas distintas de vinho como também produz aguardente envelhecida (Adega Velha) e queijo (Quinta da Aveleda). Das marcas de vinho pertencentes ao Grupo Aveleda distinguem-se Casal Garcia, Aveleda, Quinta Vale D. Maria, Quinta D'Aguieira Follies e Villa Alvor. O vinho mais famoso produzido pela empresa é o Casal Garcia branco, que surgiu em 1939, e trata-se do Vinho Verde branco português mais vendido em todo o mundo. A marca Casal Garcia conta já com 11 produtos diferentes (vinho branco, vinho rosé, vinho tinto do Douro, vinho tinto de Lisboa, vinho Verde tinto, vinho espumante branco, vinho espumante rosé, sangria tinta, sangria branca, sangria de frutos vermelhos e vinho doce) (Aveleda S.A., 2018). Para além dos seus produtos, a empresa também é conhecida pela residência familiar e os seus jardins (Figura 1).

Devido à tendência comercial da redução do uso de conservantes, um dos desafios atuais da empresa é perceber quais os melhores compostos a utilizar nas sangrias branca e de frutos vermelhos e quais as concentrações mínimas a administrar de forma a obter um produto organoleticamente estável durante um longo período de tempo. Como tal, neste estudo foi determinada a eficácia de diferentes conservantes nas sangrias branca e de frutos vermelhos, através de testes microbiológicos.

Este trabalho, no âmbito de Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar, teve como objetivo global a determinação da eficácia de diferentes conservantes nas sangrias branca e de frutos vermelhos da marca Casal Garcia, sendo que este se dividiu em objetivos mais específicos:

1. Uso de diferentes conservantes;
2. Identificação e quantificação de bolores, leveduras, bactérias acéticas e bactérias do ácido láctico;



Figura 1. Residência da família Guedes, na Quinta da Aveleda.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Sangria como produto derivado do vinho

2.1.1. Vinho

O vinho é a bebida base da sangria. Não há sangria sem vinho e não há vinho sem uva. Como tal, esta bebida alcoólica é produzida a partir da fermentação de mosto de uvas (*Vitis vinifera*). Este fenómeno ocorre graças à atividade metabólica de leveduras que transformam o açúcar presente no mosto em etanol e outros compostos, produzindo assim uma das bebidas alcoólicas mais famosas e consumidas no mundo inteiro. O vinho é uma coleção eclética de bebidas à base de uva que refletem não só as condições locais e cultivares, como também as adaptações às mudanças em atitudes culturais e avanços tecnológicos ao longo de vários milénios (Caballero, Finglas, & Toldra, 2003).

Há milhares de anos que o vinho é consumido em várias partes do planeta, por culturas diferentes. Os mesopotâmios, os chineses, os egípcios, os gregos e os romanos são exemplos de civilizações que tinham por hábito o consumo de vinho. A evidência mais antiga de uma bebida fermentada à base de uvas foi descoberta na China com cerca de 9000 anos (Castro-Swinski, 2018; Hames, 2012). No sul do Cáucaso, mais concretamente, na atual Geórgia, foram descobertas as evidências arqueológicas e arqueobotânicas mais antigas de vinho de uva e de vinicultura (cerca 6000 a.C.) (BBC News, 2017; McGovern, Jalabadze, Batiuk, Callahan, & Smith, 2017). A sua popularidade deve-se, principalmente, à segurança do seu consumo e à mudança humorística que pode provocar num indivíduo, proporcionando bom ambiente de convívio. Por este motivo, o vinho tende a ser consumido em refeições familiares ou entre amigos.

Apesar do consumo e produção de vinho datarem o início do registo da história da humanidade, o conhecimento sobre os fenómenos que levam ao seu fabrico, especialmente, a fermentação alcoólica, apenas foram descobertos e descritos claramente nos meados do século XIX. Anteriormente ao século XIX, era aceite a ideia de que o borbulhar que ocorre durante a fermentação alcoólica se devia a reações entre substâncias presentes no mosto. Com o avanço da ciência e tecnologia, e com estudos feitos por várias figuras históricas, esta noção de fermentação alcoólica e transformação de mosto de uva em vinho foi sendo moldada, ficando cada vez mais próxima aos conhecimentos atuais. Em 1680, Antonie van Leeuwenhoek observou, num microscópio construído por si mesmo, leveduras em mosto de cerveja. No

entanto, não relacionou os microrganismos com a fermentação alcoólica. Em 1785, Fabroni propôs a ideia de que este fenômeno ocorria devido a uma substância planta/animal. Charles Cagnard foi mais longe em 1837 e provou, pela primeira vez, que a levedura era um ser vivo cujas atividades vitais estavam na base da fermentação de líquidos açucarados, classificando-o como uma planta. Um ano mais tarde, em 1838, Meyen usou o termo *Saccharomyces* pela primeira vez (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2006a). Foi apenas no final do século XIX, que Antoine Lavoisier iniciou estudos químicos da fermentação alcoólica e que Louis Pasteur demonstrou que as leveduras são responsáveis pela fermentação espontânea em mosto de uva. O mesmo concebeu a ideia de que a natureza das leveduras que fermentam o mosto pode influenciar as características organolépticas do vinho. Para além disto, Pasteur também demonstrou a influência do oxigénio da assimilação dos açúcares por parte das leveduras, e que estas produzem metabolitos secundários, como o glicerol (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2006a). A comunidade científica já percorreu um longo caminho desde as grandes descobertas de Louis Pasteur, no final do século XIX. Desde então, já muitos estudos focados em temas de viticultura e enologia foram desenvolvidos com o objetivo de estender o conhecimento sobre o vinho, a sua composição química, a diversidade microbiológica e as interações químicas e bioquímicas que nele ocorrem. Estudos nas áreas científicas da química, bioquímica e microbiologia proporcionaram um desenvolvimento tecnológico que permite melhores condições no fabrico e armazenamento do vinho, aumentando a sua qualidade. É através da medição de quantidades (química analítica) que se faz o controlo de qualidade (Curvelo-Garcia & Barros, 2015).

2.1.2. Sangria

A sangria é um ponche frio com origem espanhola. É feito, classicamente, com vinho tinto ao qual é tipicamente adicionado um sumo de fruta, água gaseificada e, por vezes, brandy e fruta cortada. A palavra espanhola “sangría” significa literalmente “sangramento” (Ayto, 2012). Atualmente, existem várias receitas de sangria que diferem no tipo de vinho usado, na fruta, em especiarias e bebidas destiladas adicionadas. Para além do uso de vinho tinto, é habitual fazerem-se sangrias com vinho branco ou rosé. São também adicionadas, para além dos ingredientes referidos acima, especiarias, como hortelã, canela e gengibre, vinhos fortificados, como o vinho do Porto, e bebidas destiladas para além do brandy, como rum e vodka.

Segundo o Regulamento (UE) n.º 251/2014, a sangria, como bebida, enquadra-se na categoria de bebida aromatizada à base de vinho, ou seja, uma bebida obtida a partir de um ou mais produtos

vitivinícolas (por exemplo: vinho, vinho novo ainda em fermentação, vinho espumante natural, vinho espumante de qualidade, vinho espumante de qualidade aromático, vinho espumante gaseificado, vinho frisante natural e vinho frisante gaseificado), na qual os produtos vitivinícolas referidos representam, pelo menos, 50 % do volume total, à qual não foi adicionado álcool, à qual foram eventualmente adicionados corantes, à qual foram eventualmente adicionados mosto de uvas, mosto de uvas parcialmente fermentado ou ambos, que pode ter sido eventualmente edulcorada e com um título alcoométrico volúmico adquirido igual ou superior a 4,5 % e inferior a 14,5 %.

Sangria (português) ou sangría (espanhol) é uma bebida aromatizada à base de vinho obtida a partir de vinho, aromatizada através de adição de essências ou extratos naturais de citrinos, com ou sem sumo desses frutos, à qual foram eventualmente adicionadas especiarias, à qual foi eventualmente adicionado dióxido de carbono, que não foi corada, com um título alcoométrico volúmico adquirido igual ou superior a 4,5 % e inferior a 12 %, que pode conter partículas sólidas provenientes da polpa ou da casca de citrinos e cuja cor deve resultar exclusivamente das matérias-primas utilizadas. Para além disto, a designação “sangría” ou “sangria” só pode ser utilizada como denominação de venda quando o produto for produzido em Espanha ou em Portugal. Se o produto for produzido noutros Estados-Membros, a designação “sangría” 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...”.

2.2. Microbiologia do vinho e da sangria

2.2.1. Diversidade e dinâmica microbiológica

O perfil populacional de microrganismos que colonizam os bagos e que colonizam os mostos e o vinho, na adega, são diferentes, devido à diferença no potencial redox dos dois ambientes. Os microrganismos que colonizam maioritariamente os bagos de uvas são os fungos filamentosos, leveduras, bactérias lácticas (BAL) e bactérias acéticas (BAc) (Pardo, Mendes-Ferreira, Ferrer, & Mendes Faia, 2015).

Os fungos filamentosos são quantitativamente os mais importantes organismos que colonizam a superfície do bago e pertencem aos seguintes géneros (Figura 2): *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, entres outros. Estes influenciam a estabilidade física e química dos bagos, podem ter impacto nas características organoléticas do vinho, alguns são patogénicos para a videira, impedem

a maturação, produzem aromas desagradáveis ou produzem micotoxinas (Pardo, Mendes-Ferreira, Ferrer, & Mendes Faia, 2015).

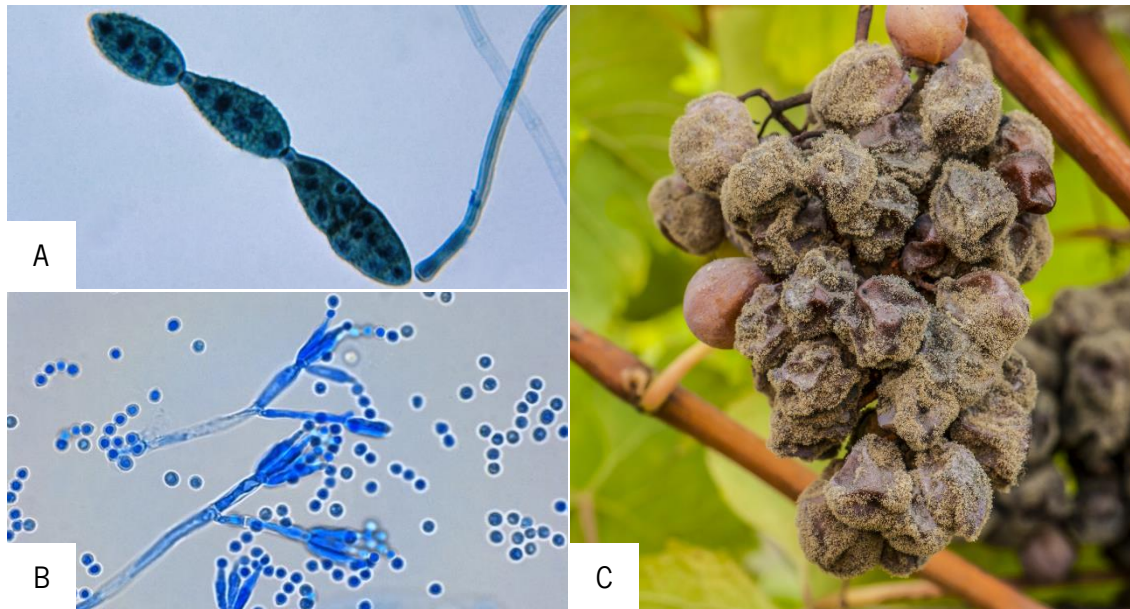


Figura 2. Fungos filamentosos que colonizam a superfície dos bagos: A) *Alternaria*, B) *Penicillium*, C) *Botrytis*.

As espécies de leveduras encontradas mais frequentemente no bago são: *Hanseniaspora uvarum* (anamorfa de *Kloeckera apiculata*) que corresponde aproximadamente a 50 % a 75 % do total das leveduras, *Metchnikowia pulcherrima* (anamorfa de *Candida pulcherrima*) e *Candida stellata*. Para além destas espécies têm sido isoladas espécies de outros géneros como *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Torulaspota*, *Dekkera* (anamorfa de *Brettanomyces*) e *Zygosaccharomyces*. Ao contrário do que seria esperado, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 3A) raramente é isolada de bagos. No entanto, parece dominar a microbiota das adegas. Nas fermentações espontâneas, as várias espécies que se desenvolvem refletem a diversidade presente no bago, desenvolvendo-se umas mais do que as outras e utilizando os substratos a diferentes velocidades metabólicas. Contudo, após a aplicação de SO_2 ao mosto, *S. cerevisiae*, que é resistente a este composto, desenvolve-se mais do que as restantes espécies. Para além disto, à medida que decorre a fermentação alcoólica, que é mediada, principalmente, por esta espécie, aumenta a dificuldade do crescimento dos microrganismos sensíveis ao etanol (Pardo, Mendes-Ferreira, Ferrer, & Mendes Faia, 2015).

As BAL são outro tipo de microrganismo frequente no mosto, vinho e sangria, uma vez que são resistentes ao etanol e a condições ácidas. Uma bactéria do ácido láctico, típica, que cresce sob condições normais (concentração de glucose não limitante, fatores de crescimento e limitação de oxigênio), é gram-positiva, não esporulada, catalase-negativa na ausência de porforinoides, aerotolerante, ácido tolerante, organotrófica, com forma de coco ou bastonete estritamente fermentativo, que produz ácido láctico como principal produto. Não possui citocromos e é incapaz de sintetizar porfirinas. Algumas características podem variar consoante as condições. Na presença de moléculas do grupo heme, podem ser formadas catalases e citocromos e o ácido láctico pode ser, posteriormente, metabolizado, resultando numa menor concentração do mesmo. A divisão celular ocorre num plano, exceto em *Pediococci*. As células são, normalmente, não móveis. Estas bactérias têm uma exigência para fatores de crescimento complexos, como vitaminas e aminoácidos (König, Uden, & Fröhlich, 2009).

As BAL obtêm a sua energia, maioritariamente, a partir da fermentação de açúcares, e, por isso, competem com as leveduras por esses recursos. Porém, durante a fermentação alcoólica, as leveduras desenvolvem-se muito mais do que outras formas microbianas, devido à maior adaptabilidade às condições do mosto. Nesta fase, a concentração de álcool aumenta no meio, o que inibe o desenvolvimento de bactérias. A população bacteriana mantém-se em concentrações muito baixas. Mas no final da fermentação, quando quase todo o açúcar se esgota, as leveduras entram em fase estacionária de crescimento. As células de leveduras multiplicam-se ativamente enquanto outras morrem. Estas últimas são fundamentais para a recuperação da população bacteriana no meio, uma vez que libertam vitaminas, bases azotadas, péptidos e aminoácidos. Estes componentes atuam como fatores de crescimento para as bactérias e, por isso, as leveduras estimulam o crescimento bacteriano (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2006a).

As BAL produzem, potencialmente, compostos antimicrobianos (König, Uden, & Fröhlich, 2009) como ácido acético, altas concentrações de dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, diacetilo, ácido piroglutâmico e bacteriocinas, que inibem o crescimento de outras espécies bacterianas e de leveduras. Nesta situação, as bactérias causam, através do seu metabolismo, a decadência das leveduras e o aumento da sua própria multiplicação.

Este fenómeno é importante para a realização da fermentação malolática, em que o ácido málico é convertido em ácido láctico e dióxido de carbono. Este processo é desejado para o fabrico de diversos vinhos com o intuito de os desacidificar, tornando-os mais suaves e organoleticamente mais apelativos. Especialmente em países do norte, onde o mosto pode ter uma maior acidez, a redução biológica com

culturas de arranque de *O. oeni* (espécie mais eficiente a realizar a fermentação malolática) é um passo importante na vinificação (König, Uden, & Fröhlich, 2009).

As BAc são um grupo de microrganismos incluído na família *Acetobacteraceae* que têm uma característica muito peculiar de oxidar o etanol para ácido acético. Esta habilidade metabólica origina uma alta capacidade de rápida oxidação de álcoois e açúcares, transformando-os nos correspondentes ácidos orgânicos, o que resulta numa fácil acumulação destes no meio (König, Uden, & Fröhlich, 2009).

Uma vez que as BAc são especializadas na rápida oxidação de açúcares e álcoois, a disponibilidade de oxigénio é fundamental para o seu crescimento e atividade. A sua atividade metabólica e crescimento são especialmente melhorados quando a concentração de oxigénio no meio é alta, seja acidentalmente ou propositadamente, como no caso da produção de vinagre.

Devido às condições anaeróbias, durante a fermentação alcoólica, a população de BAc vai diminuindo, pelo que a produção de ácido acético é limitada, embora, nalguns casos, a concentração deste ácido possa ser alta o suficiente para ser detetada sensorialmente. No final da fermentação alcoólica, quando a população de leveduras no vinho baixa, a das BAc pode aumentar. O seu crescimento pode ser significativo se os níveis de oxigénio forem altos e, conseqüentemente, produzir defeitos organoléticos no produto, nomeadamente o pico acético. Para evitar este problema é aconselhado o atesto dos recipientes de armazenamento do vinho e/ou a introdução de um gás inerte, como o azoto.

2.2.2. Contaminações microbiológicas nos vinhos e sangrias

Apesar dos avanços tecnológicos dos últimos anos no domínio da Enologia, a ocorrência de alterações microbiológicas dos vinhos é um problema ainda presente. As contaminações mais frequentes e preocupantes são de leveduras, BAL e BAc que podem ocorrer na fase inicial da fermentação do mosto, em vinhos armazenados a granel ou mesmo no produto embalado. São considerados microrganismos de deterioração microbiológica do vinho todos os microrganismos que não são desejados num determinado local ou numa determinada etapa do processo, ou seja, os que produzem maus sabores ou maus odores, que provocam alteração da cor do vinho, que formam precipitados ou depósitos, ou que tenham capacidade para o fazer nas condições normais de processamento ou armazenamento do vinho (Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkee, 1996; Curvelo-Garcia & Barros, 2015).

O mosto, o vinho e a sangria têm sempre na sua composição uma população microbiana variada, sendo que nos últimos dois não só a biodiversidade deve ser mais reduzida como também a quantidade total de células viáveis para evitar refermentações e metabolismos microbianos que podem levar a defeitos nos produtos vitivinícolas. No entanto, mesmo com os devidos procedimentos de higienização e redução da carga microbiana, podem-se formar características organoléticas indesejáveis.

Em determinados vinhos podem desenvolver-se defeitos organoléticos como odores desagradáveis provocados por compostos sulfurados durante o processo de produção. Uma das razões para isto ocorrer é a falta de fontes de azoto no mosto. Isto leva à produção de sulfureto de hidrogénio. Outra razão é a existência de genótipos de certas leveduras que estão associadas ao aumento da capacidade de produção de sulfitos. A acetoina produzida por leveduras durante a fermentação contribui para o *bouquet* do vinho, mas também se trata de um precursor do 2,3-butanediol e do diacetilo. O primeiro pode contribuir para o equilíbrio aromático, enquanto que o segundo é considerado um defeito (Esteve-Zarzoso, Martínez, Rubires, Yuste-Rojas, & Torres, 2011).

Existem várias espécies de leveduras não *Saccharomyces* que se podem desenvolver no vinho e alterá-lo de forma pejorativa. A presença de *Candida* parece estar mais associada a um problema visual pela formação de partículas no vinho. O aparecimento de um véu esbranquiçado à superfície dos vinhos expostos ao ar, insuficientemente sulfitados, está associado ao desenvolvimento desta levedura. A este defeito dá-se o nome de “flor” que, geralmente, confere ao vinho um aroma pejorativo conferido pelo etanal. Trata-se de um problema facilmente evitável com o atesto regular das vasilhas e com a sulfitação correta dos vinhos (Dias Cardoso, 2007). *Pichia* pode ter efeitos nocivos através dos elevados teores de acetato de etilo em vinhos armazenados a granel, sem controlo de SO₂ e oxigénio (Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkel, 1996). *Brettanomyces* (Figura 3D) ou *Dekkera* (forma teleomórfica) é uma levedura que pode gerar odores desagradáveis a couro, estrobaria e suor de cavalo. Estes defeitos são mais comuns nos vinhos tintos, e, principalmente, nos que estagiam em madeira. São odores provocados por etilfenóis que derivam de vinilfenóis, devido ao metabolismo desta levedura. *Saccharomycodes ludwigii* (Figura 3C), que apresenta alta resistência ao sulfuroso, pode formar colónias com uma cor castanha clara nos vinhos, o que fornece mau aspeto e pode ser considerado um dos piores defeitos para o consumidor. Este problema pode ser verificado pela inversão da garrafa o que faz com o que o depósito se mova. *Zygosaccharomyces bailii* (Figura 3B), que apresenta, normalmente, ascos com forma de haltere, que resultam da conjugação entre duas células independentes (Kurtzman & James, 2006), é uma levedura selvagem que pode, ocasionalmente, ser encontrada em produtos que contêm sumo de

fruta, como é o caso das sangrias. Não só apresenta grande tolerância a altas concentrações de etanol (> 10 %) e, por isso, está presente em ambientes de adega (Fleet, 1993), como também resistência aos ácidos benzoico e sórbico, que são usados como conservantes, e à pasteurização, sendo muito difícil erradicar de uma linha de produção contaminada (Ashurst, Hargitt, & Palmer, 2017). *Z. bailii* pode também metabolizar ácido acético durante a fermentação, independentemente da concentração de açúcares residuais. Como tal, esta levedura é capaz de crescer nas etapas finais da fermentação e é frequentemente responsável por refermentação nas garrafas de vinhos, levando à formação de depósitos e névoa que baixam a qualidade visual do produto (Conterno, Fondazione, & Henick-Kling, 2010).

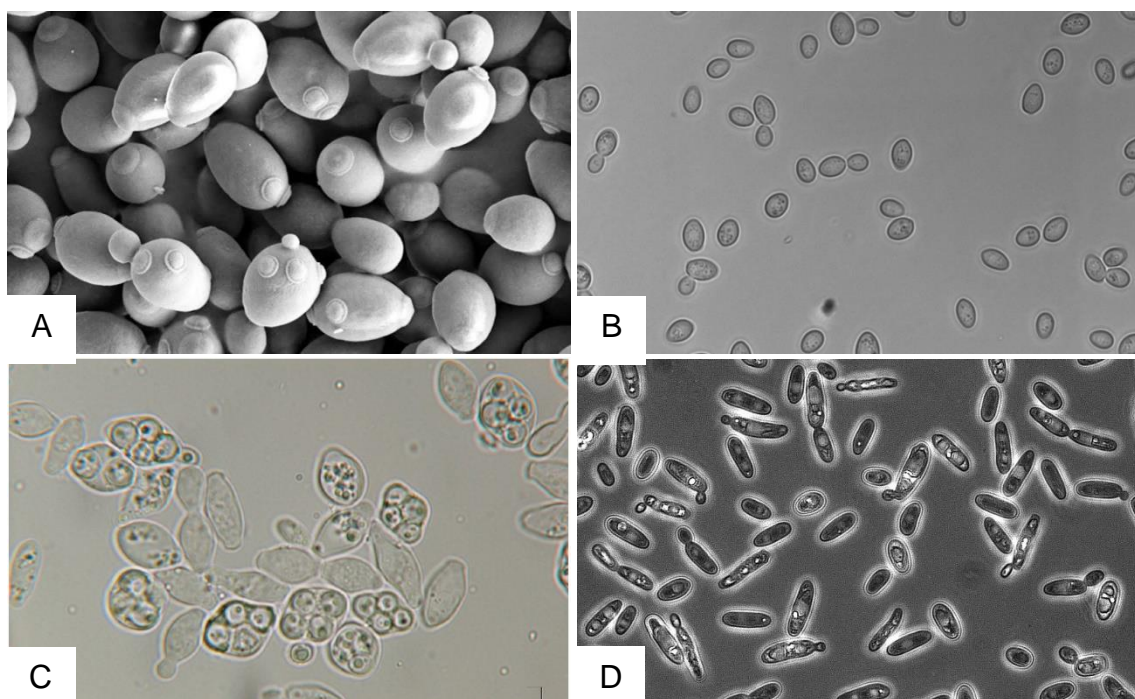


Figura 3. Leveduras presentes no vinho: que levam à fermentação alcoólica, como A) *S. cerevisiae*, e que podem levar a defeitos organoléticos como B) *Z. bailii*, C) *S. ludwigii* e D) *B. bruxellensis*.

Na fase final da fermentação alcoólica, a que corresponde o declínio das populações de leveduras, o meio enriquece-se em metabolitos que facilitam a multiplicação das BAL. É o caso dos aminoácidos, péptidos e vitaminas libertadas por autólise e ainda de polissacarídeos que adsorvem substâncias tóxicas, como os ácidos gordos em C₁₀ e C₁₂. Estas condições permitem o desenvolvimento das bactérias, nomeadamente as BAL e as BAc.

As bactérias lácticas homofermentativas ou homoláticas transformam os açúcares em ácido láctico, praticamente sem formação de produtos secundários. O processo metabólico respetivo segue a via da

glicólise, com formação do ácido pirúvico e posterior redução deste em ácido láctico, por ação da enzima lactato-desidrogenase. Já as bactérias lácticas heterofermentativas ou heteroláticas degradam os açúcares com formação de diversos compostos para além do ácido láctico, tais como o manitol, CO₂, etanol e ácido acético.

As BAL que, normalmente, crescem no vinho e originam defeitos no mesmo, pertencem aos géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*. Apesar disso, algumas destas bactérias são usadas para o melhoramento das qualidades do vinho através da transformação do ácido málico em ácido láctico (fermentação malolática – FML), nomeadamente *Oenococcus oeni*, a espécie recomendada para este tipo de alteração. A principal alteração organolética associada a este tipo de bactérias é a produção excessiva do ácido láctico. Esta ocorre quando as BAL crescem durante a fermentação alcoólica, com concentrações altas de açúcar, valores altos de pH e concentrações baixas de azoto, levando à produção de grandes concentrações de ácido acético e de ácido láctico, o que dificulta a atividade metabólica das leveduras (König, Uden, & Fröhlich, 2009). É usual o uso da expressão pico láctico para designar este problema. Verifica-se um aumento simultâneo de acidez fixa e de acidez volátil, que podem funcionar como indicadores de contaminação (Dias Cardoso, 2007). As BAL também podem influenciar as características organoléticas a partir da produção de diacetilo, acetoina, 2,3-butanediol, lactato de etilo, succinato de dietilo e acroleína (König, Uden, & Fröhlich, 2009). As alterações mais graves estão associadas ao género *Lactobacillus*, pela produção de substâncias tóxicas, em quantidades inaceitáveis, como as aminas biogénicas (Pardo, Mendes-Ferreira, Ferrer, & Mendes Faia, 2015), tais como a histamina, produzida por descarboxilação da histidina. As aminas biogénicas podem causar problemas de saúde e defeitos sensoriais no vinho (König, Uden, & Fröhlich, 2009).

As BAc são bactérias que colonizam os bagos, especialmente os deteriorados ou atacados por bolores. No vinho, são responsáveis pela oxidação do etanol a ácido acético, provocando uma alteração designada por “azedia” ou pico acético, afetando, por isso, negativamente a qualidade do vinho. Das uvas, mostos e vinhos já foram isoladas BAc dos géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e, mais recentemente, *Kozakia* (Pardo, Mendes-Ferreira, Ferrer, & Mendes Faia, 2015).

Os principais fatores para o desenvolvimento das BAc são: população inicial elevada, temperatura elevada, pH elevado, teor alcoólico baixo, concentração de SO₂ baixa e níveis de oxigénio altos, uma vez que são bactérias aeróbias.

Na uva ou mosto, a principal fonte de carbono usada pelas BAc é a glucose, que é rapidamente oxidada a ácido glucónico. A produção de ácido glucónico é importante não só pelas mudanças

organoléticas que provoca, mas também pela ligação e redução do SO_2 livre. Isto irá resultar na necessidade de uma maior dosagem de SO_2 (König, Uden, & Fröhlich, 2009). Já no vinho, o fenómeno metabólico mais importante associado às BAc consiste na transformação do etanol em ácido acético, que confere ao produto a cheiro pejorativo a azedia. Durante esta transformação são também produzidos acetaldeído e acetato de etilo, perceptíveis nos vinhos devido ao seu baixo limiar de perceção (Drysdale & Fleet, 1989). Tal como o ácido glucónico, o acetaldeído também é uma das espécies mais reativas a ligar-se ao SO_2 e, portanto, reduz a concentração da sua forma livre (Ribéreau-Gayon, Dubourdiou, Donèche, & Lonvaud, 2006a). Para além disto, as BAc produzem celulose como resultado da metabolização de açúcares, podendo resultar na produção de fibras que podem afetar a filtrabilidade do mosto/vinho (König, Uden, & Fröhlich, 2009).

2.2.3. Estabilidade microbiológica

Independentemente do tipo vinho ou sangria comercializada e independentemente da quantidade e diversidade microbiológica presentes durante o seu processo de produção, o produto final deve estar microbiologicamente estável. Só assim são evitadas refermentações, produção de maus sabores e odores, aparecimento de precipitados, turvação ou alteração da cor e é, portanto, possível garantir a qualidade do produto final ao consumidor.

Para obter estabilidade microbiológica num vinho ou sangria é necessário que certas condições se verifiquem, quer a nível das instalações, quer a nível do próprio produto. Naturalmente, um vinho ou sangria são produtos com teor alcoólico e acidez suficientemente elevados para os tornar seguros. No entanto, em alguns casos é necessária a acidificação do vinho, normalmente, com ácido málico não só para reduzir o seu pH como também pode melhorar as suas características organoléticas. Outros fatores importantes para controlar o desenvolvimento microbiológico são a baixa temperatura e baixa concentração de oxigénio, que pode ser conseguida pela adição de azoto aos recipientes onde se encontra o produto. São fundamentais as práticas da microfiltração, que retém microrganismos num filtro, e as práticas de adição de compostos antimicrobianos como o dióxido de enxofre, o sorbato de potássio e o dicarbonato de dimetilo (DMDC). Também a correta higienização e desinfeção dos equipamentos utilizados permitem garantir a máxima esterilidade no ambiente de produção e no produto.

2.3. Preservação do vinho e sangria

O vinho é uma bebida que há muito é conhecida pela sua segurança para a saúde, uma vez que o crescimento de patogénicos é dificultado pelas suas condições químicas (acidez, pH e teor alcoólico). No caso do mosto em fermentação, também é dificultado pela competição com outros microrganismos mais adaptados a essas condições, como as leveduras. Este conceito de segurança é muito velho, uma vez que, antigamente e ainda hoje em países subdesenvolvidos, o consumo de água estava e está associado à contração de doenças, como a diarreia. Este é um dos motivos pelo qual, desde a sua descoberta, o vinho se tornou numa bebida popular.

Apesar da segurança microbiológica do vinho, este pode deteriorar-se com o passar do tempo, através da oxidação, e de metabolismo de determinados microrganismos, tornando-se menos apelativo aos consumidores. É para evitar o desenvolvimento de microrganismos e também a oxidação excessiva que se aplicam conservantes no mosto e no vinho. Preservam-se assim as características organoléticas pretendidas do produto e obtém-se uma padronização do mesmo. Relativamente à sangria, os cuidados devem ser maiores, uma vez que o teor alcoólico é, em média, menor do que o do vinho e a concentração de açúcares bem maior. Isto facilita o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes, uma vez que o seu desenvolvimento se torna mais fácil.

Naturalmente o vinho já possui características conservantes, nomeadamente os ácidos orgânicos (ácido málico e o ácido tartárico, principalmente), que lhe conferem um pH baixo (3 a 4), e o etanol. Este álcool apresenta propriedades dessecantes e desnaturantes e altera a permeabilidade das membranas celulares, o que torna as células microbianas mais suscetíveis a outros agentes (Jay, Loessner, & Golden, 2005). No entanto, estas condições não são suficientes para garantir uma qualidade de produto durante um longo período de tempo. Como tal, podem e devem ser executadas várias ações para proteger o vinho da deterioração. Higienização do material de vinificação, atesto das vasilhas que contêm o vinho, uso de gases inertes nas vasilhas e administração de dióxido de enxofre são as mais comuns. Porém, existem outras intervenções como a microfiltração, o uso de ácido sórbico e de DMDC, sendo estes últimos dois mais direcionados para vinhos doces ou sangrias.

2.3.1. Dióxido de enxofre

Um dos conservantes mais usados em mostos, vinhos e sangrias é o dióxido de enxofre, mais conhecido no ramo da enologia como sulfuroso. Este é, geralmente, reconhecido como um composto seguro, quando administrado dentro dos limites estabelecidos, e é usado como antioxidante e conservante para o controlo de bactérias, bolores e leveduras deteriorantes (Joslyn & Braverman, 1954). Por este motivo, a sua adição ao vinho tem como objetivo a obtenção de um controlo microbiológico, limitando ou prevenindo a propagação de leveduras e bactérias, e a implementação de um antioxidante.

O dióxido de enxofre é um gás incolor (líquido abaixo dos $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou sob pressão) com um odor pungente característico e a solubilidade em água diminui com o aumento da temperatura (Ramis-Ramos, 2003). Em solução, transforma-se em ácido sulfuroso por hidratação, o qual se dissocia em iões sulfito e bissulfito, sendo este último altamente reativo através de mecanismos iónicos e de radicais livres (Gammon, Moore, & O'Malley, 2010).

A nível alimentar, o dióxido de enxofre, os sulfitos, os bissulfitos e os metabissulfitos são normalmente considerados seguros, embora uma fração pequena da população desenvolva febre, náuseas, diarreia, dispneia ou mesmo choque fatal após o consumo deste tipo de substâncias (Ramis-Ramos, 2003). É devido a estas reações que os rótulos de todos os produtos vitivinícolas em que é adicionado dióxido de enxofre apresentam a indicação “contém sulfitos”, uma vez que é obrigatório por lei (Regulamento Delegado (UE), 2019).

O dióxido de enxofre e os sulfitos existem em alimentos sob duas formas: livre e ligada. A primeira inclui todas as espécies de sulfuroso no estado de oxidação $+4$ (SO_2 , H_2SO_3 , SO_3^{2-} e $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$). O segundo termo é usado para descrever o conservante quando este está na forma de adutos de sulfonato (carbonil- HSO_3^-). No processamento alimentar, a concentração de sulfuroso livre traduz o seu efeito antimicrobiano e é frequentemente medido. No entanto, existe um problema específico com esta determinação: a sua concentração diminui ao longo do tempo devido a reações com componentes alimentares e também à autooxidação após a abertura da embalagem e, consequentemente, exposição ao ar (Caballero, Finglas, & Toldra, 2003). Por este motivo, a sua medição deve ser feita, no caso de produtos vitivinícolas, o mais próximo possível do engarrafamento.

Se a contaminação de leveduras não for excessiva, o SO_2 combinado com temperaturas baixas pode preservar mosto e vinho. No entanto, a sua administração tem de ser controlada: a adição de dióxido de enxofre antes da fermentação alcoólica deve ser limitada tanto quanto possível, uma vez que a

combinação com acetaldeído não tornará a solução com efeitos antissépticos nem antioxidantes no vinho resultante; os conteúdos totais de dióxido de enxofre quando marcados devem, pelo menos, cumprir com os limites estabelecidos pelo Regulamento (CE) n.º 606/2009; e os produtos usados devem cumprir com as prescrições do Código do OIV (OIV, 2018).

Este composto, como conservante, tem as suas limitações: a eficácia é fortemente influenciada pelo pH, o seu uso pode resultar em odores e sabores desagradáveis e mesmo desencadear respostas alérgicas (Stevenson & Simon, 1981). Por estes motivos, a indústria procura formas de minimizar a quantidade de SO₂ em vinhos (Threlfall & Morris, 2002).

2.3.2. Sorbato de potássio/ácido sórbico

O sorbato de potássio é um aditivo classificado como conservante que é adicionado a uma grande variedade de alimentos. Este, em solução, é dissociado a ácido sórbico, um ácido orgânico fraco e considerado um conservante altamente eficiente, seguro e não tóxico, que substitui o ácido benzoico, um conservante tradicional. Atualmente, o ácido sórbico é aprovado mundialmente e frequentemente usado com sucesso como um produto padrão em vários ramos da indústria alimentar (Jorge, 2003).

No setor vitivinícola, a máxima dose de ácido sórbico permitida por lei em produtos vitivinícolas é 200 mg/L (Regulamento (CE) n.º 606/2009). É comum, e defendida, a mistura de sulfitos com ácido sórbico, pois este serve para prevenir fermentações posteriores, motivo principal da sua aplicação, enquanto que os sulfitos protegem contra a deterioração química e bacteriana (Caballero, Finglas, & Toldra, 2003). O ácido sórbico é usado, habitualmente, em sumos de fruta, concentrados de fruta, compotas e doces de fruta, cuja concentração em açúcar é alta, o que torna a sua aplicação apelativa em sangrias.

Apesar da sua eficácia como conservante no ramo vitivinícola, que é mediada pelo pH, teor alcoólico, concentração de SO₂ e quantidade e natureza das leveduras presentes no vinho (Tiziana Lisanti, Blaiotta, Nioi, & Moio, 2019), o ácido sórbico mostra-se menos eficaz contra *Z. bailii*, que é capaz de crescer no vinho e sangria com níveis deste conservante muito superiores aos permitidos por lei (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). O ácido sórbico deve ser sempre usado em combinação com uma dose suficientemente alta de dióxido de enxofre livre para prevenir reações oxidativas e qualquer atividade bacteriana (Tiziana Lisanti, Blaiotta, Nioi, & Moio, 2019).

2.3.3. DMDC

O dimetil dicarbonato (DMDC – dimethyl dicarbonate) é um conservante usado como inibidor de leveduras em vinhos, sangrias e sumos de fruta, cuja concentração máxima legal é de 200 mg/L em produtos vitivinícolas (Regulamento (CE) n.º 606/2009). Este, em solução aquosa, é hidrolisado a dióxido de carbono e metanol. Felizmente, estes compostos são produzidos em pequenas concentrações e não são, por isso, considerados prejudiciais. Como vantagens, este conservante não produz nenhum odor ou sabor residual no produto e não é tão dependente do pH como o dióxido de enxofre. No entanto, não o pode substituir como antioxidante nem como agente antimicrobiano a longo prazo, mas o seu uso pode minimizar as quantidades aplicadas de SO_2 , que é um objetivo global (Threlfall & Morris, 2002).

O modo de ação antimicrobiana do DMDC baseia-se na inibição enzimática, após a penetração nas células, fazendo com que os microrganismos sejam eliminados (Figura 4) (Lanxess, 2009). Este composto reage irreversivelmente com aminas em locais ativos de enzimas celulares (em particular, a álcool-desidrogenase e a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) (Tiziana Lisanti, Blaiotta, Nioi, & Moio, 2019).

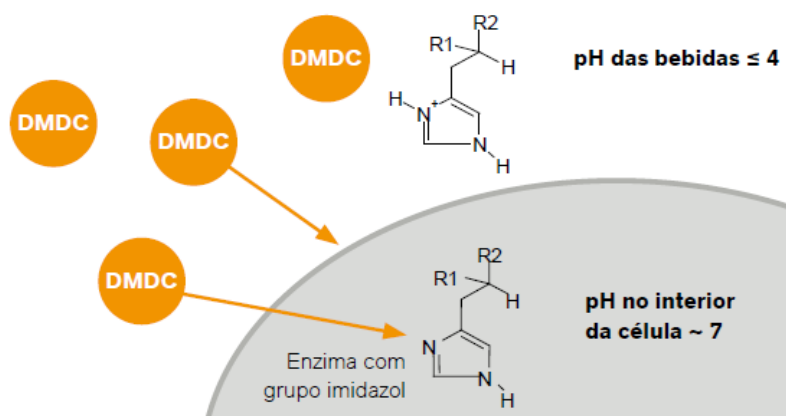


Figura 4. Modo de ação do DMDC em microrganismos (Lanxess, 2009).

A sua eficácia depende de vários fatores: espécies microbianas, estirpes microbianas, populações iniciais, composição química do produto, temperatura, modalidade de aplicação (Tiziana Lisanti, Blaiotta, Nioi, & Moio, 2019). Trata-se de um conservante mais eficaz a prevenir o crescimento de leveduras do que o crescimento de bactérias.

Para uma adequada administração ao vinho ou sangria, o DMDC deve ser adicionado um pouco antes do enchimento. A concentração não deve ser superior a 200 mg/L, devido aos produtos originados a partir da sua hidrólise e o produto não deve ser comercializado enquanto o DMDC é detetável (OIV, 2018).

2.3.4. Microfiltração

A microfiltração é uma técnica de separação usada para eliminar sólidos em suspensão de um líquido que passa através de um filtro constituído por uma camada porosa que retém partículas sólidas. Um dos princípios desta técnica quando aplicada ao vinho e à sangria é que a remoção das partículas deve ser feita de forma a evitar modificações na estrutura química que possam levar a uma alteração do odor ou sabor do produto. A microfiltração, apesar de não ser considerada um conservante, pois não é um composto químico, tem um papel fundamental na preservação do vinho. Para além de evitar a presença de microrganismos no vinho e na sangria, confere transparência, o que melhora o seu aspeto visual, e também estabiliza físico-quimicamente o produto. Existem vários tipos de filtração, havendo a possibilidade de usar diferentes materiais e equipamento. Os tipos mais comuns na produção de vinho são a filtração através de um pré-revestimento de terra de diatomáceas, também conhecido por diatomito, a filtração através de folhas de celulose ou módulos lenticulares, a filtração através de membranas poliméricas sintéticas, com poros calibrados e filtração tangencial através de membranas orgânicas ou inorgânicas. Ao contrário da filtração frontal, na filtração tangencial, o vinho flui paralelo à superfície do filtro, minimizando o entupimento (Ribéreau Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2006b). Independentemente do tipo de filtração, os materiais usados não podem apresentar um risco para a saúde humana (OIV, 2018).

2.3.5. Outros métodos de preservação

Para além dos métodos mais comuns de preservação dos produtos vitivinícolas, existem métodos alternativos que podem ser classificados como métodos químicos para substituição e redução do SO_2 e métodos físicos inovadores para estabilização microbiológica. Estes métodos não estão autorizados nas práticas enológicas devido vários fatores: falta de estudos que comprovem a sua eficácia a nível industrial (apesar de haver essa demonstração em ambiente laboratorial), a sua eficácia varia consoante a

composição físico-química do produto, custo elevado do método e grandes mudanças no sistema de produção. No entanto, estes métodos continuam a ser explorados com a intenção de diminuir as concentrações de conservantes químicos mais nocivos para o ser humano nos produtos vitivinícolas, de forma a torná-los mais sustentáveis a nível ambiental. Para além disso, também é do interesse geral das empresas tornar os seus produtos mais apelativos aos consumidores e torná-los mais abrangentes, atingindo outros públicos, como as pessoas alérgicas aos sulfitos. Assim, diminuem-se os problemas relacionados com a saúde dos consumidores.

Segundo Tiziana Lisanti *et al.* (2019), como os métodos químicos alternativos existem bacteriocinas, antibióticos, nanopartículas de prata, hidroxitirosol, ácidos gordos de cadeia curta/média, *yeast killer toxins*, e péptidos antimicrobianos. As bacteriocinas são pequenos polipéptidos, produzidos por estirpes de BAL, capazes de inibir outras estirpes bacterianas. Antibióticos, como a natamicina, tem propriedades antifúngicas, devido à sua ligação ao ergosterol da membrana celular dos fungos. Nanopartículas de prata, como o complexo coloidal de prata (CSC) inibem o crescimento bacteriano e de leveduras. Hidroxitirosol é um álcool fenílico com grande atividade antimicrobiana e antioxidante. Os ácidos gordos de cadeia curta/média afetam bactérias e, principalmente, leveduras pela mudança da permeabilidade da membrana celular. *Yeast killer toxins*, também conhecidas por *killer factors*, são proteínas ou glicoproteínas cuja ação é mediada por recetores na parede celular e plasma das leveduras e fungos sensíveis. Os péptidos antimicrobianos, produzidos naturalmente por *S. cerevisiae* durante a fermentação alcoólica, inibem *O. oeni* e várias leveduras deteriorantes, com ação disruptiva da permeabilidade e funções da membrana celular (Tiziana Lisanti, Blaiotta, Nioi, & Moio, 2019).

Segundo Tiziana Lisanti *et al.* (2019), os métodos físicos inovadores para estabilização microbiológica são a alta pressão, o ultrassom, a radiação ultravioleta, a tecnologia de campo elétrico pulsado e as micro-ondas. A alta pressão trata-se da aplicação de alta pressão hidrostática, com pressões entre os 100 MPa e os 1000 MPa aplicadas nos produtos de forma instantânea e uniforme, que afetam a conformação das proteínas e estruturas celulares. O ultrassom é a aplicação de ondas sonoras com grande energia (20 kHz a 100 kHz) que provocam cavitação, desbaste nas membranas celulares e produzem radicais livres. A radiação ultravioleta é a incidência de radiação com comprimentos de onda entre os 100 nm e os 400 nm, sendo os UV-C, com 200 nm a 280 nm, a gama mais eficaz contra microrganismos, que provoca modificações no DNA, impedindo a proliferação microbiana. A tecnologia de campo elétrico pulsado é a aplicação de campos elétricos de alta intensidade (5 kV/cm – 50 kV/cm) como uma sequência de pulsos com uma frequência de microssegundos entre si, levando à

eletroporação das membranas celulares, o que resulta na perda de funcionalidade e colapso celular. A tecnologia de micro-ondas trata-se da aplicação de radiação com uma frequência entre os 300 MHz e os 300 GHz que muda os campos elétricos e magnéticos que determinam a condução iónica e a rotação dipolar de iões e moléculas polares, o que provoca um aumento da temperatura, eliminando os microrganismos (Tiziana Lisanti, Blaiotta, Nioi, & Moio, 2019).

2.4. Métodos de análise microbiológica

Após a consideração da diversidade e dinâmica microbiológica, dos defeitos que advêm do metabolismo de determinados microrganismos, estejam eles associados ao sabor, odor ou aspeto, e também das diferentes formas de preservar o produto, é prudente executar procedimentos de controlo microbiológico. Para efetuar esse controlo determinam-se não só quais os tipos de microrganismos existentes no mosto, vinho ou sangria, como também a sua concentração. Para tal são realizadas análises microbiológicas de identificação e contagem.

2.4.1.1. Identificação de microrganismos

Relativamente à identificação de microrganismos no vinho e sangria, existem várias técnicas disponíveis: provas presuntivas, cultivo em meios diferenciais e/ou seletivos, métodos moleculares e tipagem. Estes métodos variam em diversos fatores como o preço, o tempo de duração da análise, a especificidade, o rigor, entre outros, e por isso, a escolha do método a usar deve ter em consideração todos os estes fatores e adequar-se o melhor possível aos objetivos da análise.

As provas presuntivas baseiam-se em características gerais dos microrganismos como a morfologia, o agrupamento celular, a coloração de Gram, a vulnerabilidade da parede celular ao hidróxido de potássio e o tipo de metabolismo relativamente ao uso de oxigénio (metabolismo aeróbio ou metabolismo anaeróbio) (Pardo, Mendes-Ferreira, Ferrer, & Mendes Faia, 2015). Estes testes podem ser feitos rapidamente, são baratos, mas pouco específicos e apenas conjugados permitem tirar conclusões sobre o grupo de microrganismos presentes no vinho ou sangria (leveduras, bolores, BAc e BAL). Para identificação de leveduras podem ser efetuados testes mais específicos como a verificação do tipo de divisão celular (cisão binária, gemulação bipolar ou multipolar) e a ocorrência ou não de esporos.

Os meios de cultura seletivos e diferenciais, que para além de análises de identificação de microrganismos também servem para a sua contagem, possuem na sua formulação constituintes que, seletivamente, favorecem o crescimento de um determinado grupo em detrimento de outros e contêm substratos e/ou indicadores ácido-base que permitem uma identificação mais fácil e menos subjetiva do microrganismo-problema. A modificação da cor do meio de cultura e/ou a intensidade e especificidade das cores das colónias tornam as tarefas de contagem e identificação mais fáceis e rápidas (Pardo, Mendes-Ferreira, Ferrer, & Mendes Faia, 2015).

Métodos mais recentes de identificação de microrganismos são os métodos moleculares, que permitem a identificação de espécies de um modo mais rápido e fiável. Os métodos moleculares podem ser de hibridação de ácidos nucleicos, de amplificação, de sequenciação ou digestão enzimática de ácidos nucleicos e ribotipagem. No entanto, estes métodos são pouco usados na indústria vitivinícola devido ao seu custo elevado e necessidade de mão de obra especializada.

2.4.1.2. Contagem de microrganismos

Em microbiologia, o crescimento é definido como o aumento do número de indivíduos. O crescimento da população microbiana pode ser determinado pela contagem do número de indivíduos ou pela alteração da quantidade de algum componente celular, incluindo-se neste último caso as proteínas, os ácidos nucleicos ou peso seco da biomassa celular.

Os métodos mais simples requerem o uso de microscópio e permitem a contagem de células totais (viáveis e não viáveis). Este tipo de exame tem como objetivo a deteção e diferenciação de grupos de microrganismos possam estar presentes, relativamente ao seu tamanho e forma. No entanto, a observação microscópica não permite a distinção entre microrganismos viáveis e não viáveis, exceto nos casos em que é usada coloração adequada. Esta técnica baseia-se na ampliação feita pelo microscópio o que permite a observação de microrganismos. Exemplos destes tipos de métodos são a câmara de Petroff-Hausser e o método de Breed. Apesar da rapidez e simplicidade, são métodos com algumas desvantagens: requerem um número de células relativamente grande e não permitem discriminar as células vivas/viáveis. No entanto, o método de Petroff-Hausser pode ser complementado, usando a coloração com azul de metileno o que permite a contagem de células viáveis. A citometria de fluxo permite conjugar a velocidade com o rigor e estimar com grande confiança o número de células presentes numa suspensão. Dependendo do tipo de corante que se usa, sendo que os que fornecem melhores

informações são os corantes fluorescentes, é possível determinar o número de células viáveis e até discriminar o número de leveduras. As grandes desvantagens são o preço para o equipamento e manutenção e a necessidade de um treino específico do pessoal de execução da análise (Pardo, Mendes-Ferreira, Ferrer, & Mendes Faia, 2015). Esta técnica é definida como o estudo de células isoladas num fluxo líquido, tratando-se de um método quantitativo e qualitativo usado para caracterizar partículas em suspensão num líquido. Um citómetro de fluxo é composto, basicamente, por três sistemas: fluídico, ótico e eletrónico (Longin, Petitgonnet, Guilloux-Benatier, Rousseaux, & Alexandre, 2016). Embora o objetivo principal da citometria de fluxo seja fornecer informações sobre a existência de determinados microrganismos e o nível populacional dos mesmos, também é possível obter informações extra através do uso de diferentes corantes, como a viabilidade, vitalidade, e por sua vez a atividade celular e a presença de células viáveis não cultiváveis. Ter uma noção de todos estes fatores permite uma melhor monitorização das fermentações alcoólica e malolática. A citometria também pode ser conjugada com testes de imunidade (imunocitometria), permitindo uma identificação e quantificação rápida de microrganismos deteriorantes como *Brettanomyces*.

Para além das técnicas baseadas em microscopia, existem técnicas baseadas na cultura de microrganismos em placas de Petri. Este tipo de análise pode ser executado de três formas distintas: sementeira em placa à superfície, sementeira em placa por incorporação ou sementeira com filtração prévia. Neste último caso, a membrana filtrante possui poros de 0,22 µm a 0,45 µm (para pesquisa de bactérias e leveduras, respetivamente). Após a filtração, o filtro é colocado em cima do meio de cultura apropriado para a cultura dos microrganismos alvo. Esta técnica, que parte do pressuposto de que uma colónia deriva de uma célula apenas, permite não só determinar o número de células viáveis numa suspensão, como permite depois visualizar a morfologia colonial dos microrganismos presentes como a forma, a dimensão, a cor das colónias e a formação ou não de pigmentos que facilitam a identificação. Apresenta, no entanto, desvantagens: o pressuposto anteriormente mencionado pode levar a conclusões erradas, pois uma colónia pode ser originada de várias células, e pode ser moroso porque depende do tempo de incubação de cada tipo de microrganismo (Pardo, Mendes-Ferreira, Ferrer, & Mendes Faia, 2015).

A contagem de microrganismo também pode ser feita com métodos indiretos: análise da turvação do meio através de espetrofotometria, determinação do peso seco da população microbiana através da filtração do vinho, pela determinação do número mais provável (*NMP*) em que se fazem diluições

sucessivas e se recorrem a tabelas de MacGrady ou pela quantificação de determinados compostos que são metabolizados pelos microrganismos (Pardo, Mendes-Ferreira, Ferrer, & Mendes Faia, 2015).

Mais recentemente, foram sugeridos métodos moleculares como ferramentas para deteção e enumeração rápidas de microrganismos, de forma a controlar de forma eficaz e eficiente a deterioração microbiológica de produtos vitivinícolas. A técnica de qPCR celular (do inglês: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) com a lise mecânica de células, que não exige extração de DNA, mostrou ser rápida, direta, sensível e confiável para a quantificação de leveduras específicas e populações totais de leveduras em vinho (Santos, Pardo, & Ferrer, 2017). Outra técnica molecular promissora é o microarranjo de oligonucleótidos que contém sondas para determinadas moléculas-alvo de forma a obter um resultado quantitativo, como expressão génica. Esta técnica permite uma deteção específica de diferentes microrganismos deteriorantes presentes num vinho contaminado (Cimaglia, Tristezza, Saccomanno, & Grieco, 2017). A capacidade de deteção é elevada, uma vez que permite a distinção de várias espécies de leveduras, BAL e BAc, mostrando a praticabilidade desta técnica para o controlo de contaminações na indústria vitivinícola.

3. Materiais e métodos

Neste estudo foram analisadas amostras de sangrias branca e de frutos vermelhos cuja caracterização físico-química foi obtida através de análises de rotina da Aveleda S.A., normalmente executadas e guardadas para controlo de qualidade dos produtos (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1. Caracterização físico-química das sangrias branca e de frutos vermelhos (em produto não acabado). *MV* – massa volúmica. *TAV* – título alcoométrico volúmico. *C_{açúc}* – concentração de açúcares. *AT* – acidez total como ácido tartárico. *AV* – acidez volátil como ácido acético

Produto	<i>MV</i> /(g/L)	<i>TAV</i> %	<i>C_{açúc}</i> /(g/L)	<i>AT</i> /(g/L)	<i>AV</i> /(g/L)
SB	1014,2	8,00	64,8	6,00	0,49
SFV	1002,9	7,95	70,08	6,90	0,61

A metodologia deste estudo foi constituída por duas vertentes: a vertente microbiológica e a vertente química. A vertente microbiológica teve por base análises microbiológicas de contagem de colónias pelo método de filtração e microscopia, com o objetivo de identificar os microrganismos presentes e quantificar as unidades formadoras de colónias de bolores, leveduras, bactérias acéticas (BAc) e, no caso da sangria de frutos vermelhos, bactérias lácticas (BAL). Isto deve-se ao facto do vinho proveniente para este último produto pode ter sido submetido, intencionalmente ou não, à fermentação malolática, na qual há grande atividade metabólica por parte de BAL. A vertente química teve por base análises de quantificação de ácido sórbico, um conservante presente nas sangrias. Esta quantificação teve o objetivo de confirmar a concentração do conservante na sangria e foi feita através de dois métodos distintos: espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Tabela 2. Caracterização físico-química das sangrias branca (SB) e de frutos vermelhos (SFV) em produto acabado. *C_{SO2 livre}* – concentração de SO₂ livre. *C_{SO2 total}* – concentração de SO₂ total. *C_{O2}* – concentração de O₂. *C_{CO2}* – concentração de CO₂

Produto	<i>C_{SO2 livre}</i> /(mg/L)	<i>C_{SO2 total}</i> /(mg/L)	<i>C_{O2}</i> /(g/L)	<i>C_{CO2}</i> /(g/L)
SB	59	164	0,49	2,34
SFV	54	156	0,55	3,25

3.1. Planeamento experimental

Foram considerados três pontos de recolha de amostras diferentes para a realização deste estudo. Um deles foi para a recolha de garrafas de Casal Garcia Sangria de Frutos Vermelhos e os outros dois para a recolha de garrafas de Casal Garcia Sangria Branca.

Foram recolhidas na linha de produção catorze garrafas de Casal Garcia Sangria de Frutos Vermelhos (produto acabado, não rotulado), contendo ácido sórbico na sua constituição (numa concentração pré-estabelecida e calculada de 150 mg/L) e catorze garrafas de Casal Garcia Sangria Branca (produto acabado, não rotulado), contendo ácido sórbico e dicarbonato de dimetilo (DMDC) na sua constituição. Para cada um dos grupos de amostras: foram analisadas duas garrafas no tempo inicial do estudo (t_0); seis garrafas foram armazenadas à temperatura ambiente no armazém de amostras da Aveleda S.A., cuja temperatura durante o armazenamento nunca foi inferior a 12 °C e nunca superior a 19 °C, de forma a simular boas condições de armazenamento (

Figura 5), sendo que cada uma delas foi analisada nos diferentes tempos de armazenamento: t_1 (1 mês após recolha), t_2 (2 meses após recolha), t_3 (3 meses após recolha), t_4 (4 meses após recolha), t_5 (5 meses após recolha) e t_6 (6 após recolha); seis garrafas foram armazenadas numa estufa cuja temperatura se manteve a 45 °C, de forma a simular más condições de armazenamento (

Figura 5), sendo cada uma delas foi analisada nos diferentes tempos de armazenamento: t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , t_5 e t_6 . A nomenclatura para as amostras de sangria de frutos vermelhos foi SFV+AS, seguido pela respetiva temperatura, em graus celsius, e tempo de armazenamento, em meses (por exemplo, SFV+AS-20- t_1). A nomenclatura das amostras de sangria branca foi SB+AS+DMDC, seguido pela respetiva temperatura, em graus celsius, e tempo de armazenamento, em meses (por exemplo, SB+AS+DMDC-45- t_6).

Relativamente ao outro grupo de amostras de sangria branca, foram recolhidas, na linha de produção, trinta e seis garrafas de Casal Garcia Sangria Branca (produto acabado, não rotulado), contendo ácido sórbico na sua constituição. Três garrafas foram analisadas no tempo inicial do estudo (t_0). Dezoito garrafas foram armazenadas à temperatura ambiente no armazém de amostras da Aveleda S.A., cuja temperatura durante o armazenamento nunca foi menor do que 12 °C e nunca foi superior a 19 °C. Cada uma delas foi analisada nos diferentes tempos de armazenamento, em triplicado: t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , t_5 e t_6 . Dez garrafas foram armazenadas numa estufa cuja temperatura se manteve no 45 °C,

de forma a simular más condições de armazenamento. Para os tempos t_1 , t_2 , t_3 , foi analisada uma garrafa. Para os tempos t_4 , t_5 , foram analisadas garrafas em duplicado. Para o tempo t_6 a análise foi efetuada em triplicado.



Figura 5. Amostras SB+AS+DMDC e SVF+AS armazenadas à temperatura ambiente, na sala de amostras da Aveleda S.A. (esquerda) e amostras SB+AS+DMDC e SVF+AS armazenadas a 45 °C, na estufa.

As restantes garrafas foram utilizadas para as análises de determinação do ácido sórbico (três por espectrofotometria e duas por HPLC). A nomenclatura destas amostras foi a seguinte: SB+AS (sangria branca com ácido sórbico) seguido pela respetiva temperatura, em graus celsius, e tempo de armazenamento, em meses (por exemplo, SB+AS-20- t_0). Todo o planeamento experimental está representado na Figura 6.

As análises microbiológicas de contagem de microrganismos e microscopia foram efetuadas no Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (IVDP). As amostras de sangria foram enviadas mensalmente para o IVDP devidamente identificadas e os resultados foram devolvidos em forma de boletins de análise pelo instituto.

Tal como as análises microbiológicas, as análises de quantificação do ácido sórbico através do método de HPLC foram efetuadas no IVDP. As amostras de sangria foram enviadas para o IVDP devidamente identificadas e os resultados foram devolvidos em forma de boletins de análise pelo instituto.

As análises de quantificação do ácido sórbico através do método de espectrofotometria foram efetuadas no laboratório da Aveleda S.A.

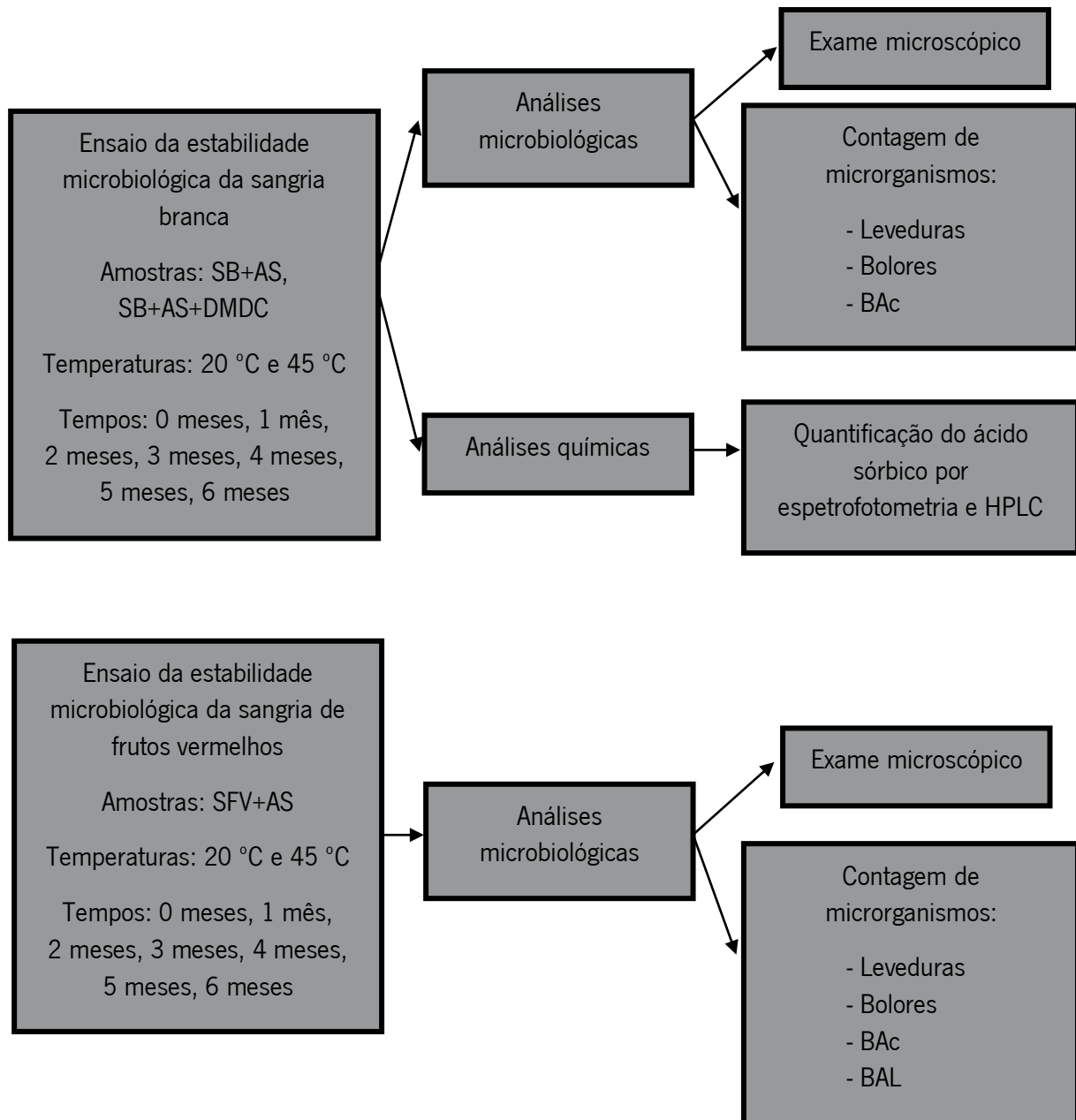


Figura 6. Organograma do planeamento experimental.

3.2. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas realizadas neste estudo foram efetuadas no Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto – IVDP. Foram executados dois métodos diferentes para análises microbiológicas: exame óptico de líquidos e depósitos e contagem de microrganismos em meio de cultura. As amostras de sangria foram enviadas, mensalmente, da Aveleda S.A. para o IVDP desde novembro de 2018 a setembro de 2019. Os pedidos de análise da sangria branca incluíram o exame microscópico e a contagem de leveduras, bolores e BAc. Os pedidos de análise da sangria de frutos vermelhos incluíram o exame microscópico e a contagem de leveduras, bolores, BAc e BAL.

Para as amostras SB+AS+DMDC e SFV+AS, apenas no tempo inicial foram analisadas em duplicado. As amostras SB+AS do tempo inicial e dos restantes tempos à temperatura ambiente foram analisadas em triplicado. As amostras SB+AS dos tempos t_4 e t_5 foram analisadas em duplicado e a do tempo t_6 foi em triplicado.

3.2.1. Exame microscópico de líquidos e depósitos

O exame microscópico de líquidos e depósitos foi feito de acordo com o preceituado no método OIV-MA-AS4-01:R2010 (ponto 5), para a análise microbiológica de vinhos e de mostos, integrante do compêndio internacional de métodos de análise de vinhos e mostos da Organização Internacional da Vinha e do Vinho – OIV.

Para cada amostra de sangria, foi colocada uma gota numa lâmina e esta observada ao microscópio. Foram discriminadas e contadas várias formas: bactérias (cocos, bactérias curtas, bastonetes, filamentos bacterianos), leveduras (isoladas, grupos, cadeia), fungos (hifas, esporos), formas curtas suspeitas, detritos (agregados, com matéria corante) e cristais (lamelares, prismáticos, agulha). Dado o cariz microbiológico do trabalho, na discussão, apenas foram consideradas as bactérias, leveduras, fungos e formas curtas suspeitas

Para as amostras SB+AS+DMDC e SFV+AS, apenas no tempo inicial foram analisadas em duplicado. As amostras SB+AS do tempo inicial e dos restantes tempos à temperatura ambiente foram analisadas em triplicado. As amostras SB+AS dos tempos t_4 e t_5 foram analisadas em duplicado e a do tempo t_6 foi em triplicado.

3.2.2. Contagem de microrganismos em meio de cultura

O exame de contagem de microrganismos em meio de cultura feito de acordo com o preceituado no método OIV-MA-AS4-01:R2010 (ponto 6), para a análise microbiológica de vinhos e de mostos, integrante do compêndio internacional de métodos de análise de vinhos e mostos da Organização Internacional da Vinha e do Vinho – OIV.

Para cada amostra e para cada tipo de microrganismo (bolores, leveduras, bactérias do ácido acético e bactérias do ácido láctico) foi feita uma filtração. Para a contagem de bolores e leveduras foram usados filtros estéreis com uma porosidade de 0,45 μm . Para a contagem de bactérias foram usados filtros estéreis com uma porosidade de 0,22 μm . Para a maioria das amostras, foram filtrados 100 mL. Nas exceções, o volume filtrado foi de 50 mL. Apenas um valor discutido no trabalho se encontra nestas condições e está devidamente mencionado. Após a filtração, os filtros foram colocados sobre um meio de cultura específico para cada tipo de microrganismo, numa placa de petri. Nos casos da pesquisa de bolores, leveduras e bactérias acéticas, as placas foram colocadas numa estufa durante, pelo menos, quatro dias, a uma temperatura que nunca excedeu os 28 °C. No caso das bactérias lácticas, as placas foram colocadas numa estufa, dentro de um jarro anaeróbio, durante 10 dias, a uma temperatura de 30 °C \pm 2 °C. Após incubação, as placas foram retiradas da estufa e contou-se o número de unidades formadoras de colónias (*UFC*).

3.3. Análise do ácido sórbico

Foi determinada a concentração de ácido sórbico na sangria branca para confirmação da concentração pré-estabelecida administrada no produto. A determinação também permitiu relacionar a estabilidade microbiológica com a concentração deste conservante. A concentração do ácido sórbico foi determinada de duas formas diferentes: HPLC e espectrofotometria.

3.3.1. Determinação da concentração do ácido sórbico por HPLC

A determinação da concentração do ácido sórbico por HPLC teve por base o método MIVDP73 – 05 praticado pelo IVDP. A determinação deste conservante por este método foi efetuada em duas amostras SB+AS.

3.3.2. Determinação da concentração do ácido sórbico por espectrofotometria

A determinação da concentração do ácido sórbico foi efetuada por espectrofotometria, e teve por base o método de determinação do ácido sórbico OIV-MA-AS313-14A:R2009, do Compêndio Internacional de métodos de análise de vinhos e mostos do OIV. No entanto, este método não foi executado exatamente como está escrito no protocolo do OIV. O documento consultado foi um protocolo presente no laboratório da Aveleda S.A.

Foram preparadas quatro soluções-padrão a partir de uma solução de ácido sórbico, com uma concentração de 20 mg/L, com as seguintes concentrações de ácido sórbico: 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,5 mg/L e 5 mg/L. A absorvância destas soluções e das amostras foi medida num espectrofotómetro a 256 nm (Figura 7B), usando água destilada como branco. Foi produzida uma curva de calibração da absorvância em função da concentração (Equação 1).

A uma amostra de 10 mL, colocada num recipiente de destilação a vapor borbulhador foi adicionado 1 g de ácido tartárico. A destilação foi efetuada num aparelho Cazenave-Ferré (Figura 7A). Foram recolhidos 250 mL de destilado. Depois, 25 mL do destilado foram colocados num balão de 100 mL, e fez-se o volume com água destilada. A absorvância foi medida a 256 nm, contra um branco de água destilada. A concentração de ácido sórbico foi determinada a partir da multiplicação do valor obtido, automaticamente, no espectrofotómetro, através da reta de calibração (Equação 1) e o valor de 1000, correspondente à diluição da amostra durante a análise.

$$Abs_{256} = 0,2222 \times \frac{c}{\text{mg/L}} - 0,0096 ; R^2 = 0,9999 \text{ (Equação 1)}$$

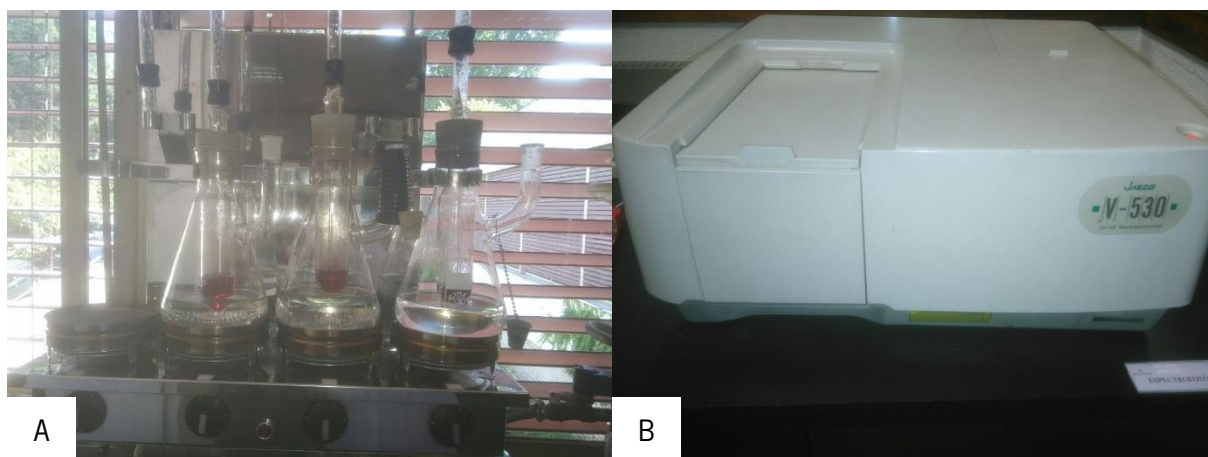


Figura 7. Aparelho Cazenave-Ferré onde foi efetuada a destilação de sangria branca para a extração do ácido sórbico (A). Espectrofotômetro Jasco V-530 de radiação visível e ultravioleta (B).

4. Resultados e discussão

4.1. Análises microbiológicas

Todas as análises microbiológicas, bem como a leitura dos resultados obtidos, foram realizadas pelo IVDP, a pedido do laboratório da Aveleda S.A (Anexo I – Figuras I.1, I.2 e I.3).

4.1.1. Exame microscópico de líquidos e depósitos

O exame microscópico demonstrou a presença de microrganismos nos três grupos de amostras, tanto nas que foram reservadas à temperatura ambiente como nas que foram reservadas na estufa a 45 °C. Mais detalhadamente, entre outras formas, foram contadas bactérias com forma de bastonete, leveduras isoladas e “formas curtas suspeitas”. Estas contagens estão salientadas, uma vez que são de microrganismos, ou potenciais microrganismos. As restantes apontavam para detritos ou cristais, que são menos relevantes no estudo. Verificou-se que, geralmente, o número de formas curtas suspeitas foi mais elevado do que o número de bactérias ou leveduras (Figura 8, Figura 9 e Figura 10).

Relativamente às sangrias brancas com ácido sórbico, em que houve amostras em duplicado e triplicado, o valor médio mínimo de formas curtas suspeitas foi 3 no tempo inicial, o de leveduras isoladas foi 1 em vários tempos nas diferentes temperaturas de armazenamento (t_0 , t_1 , t_4 e t_5 à temperatura ambiente, e t_1 , t_2 e t_4 a 45 °C), e o de bactérias bastonetes foi também 1 em vários tempos nas diferentes temperaturas de armazenamento (t_0 e t_2 à temperatura ambiente, e t_2 , t_3 , t_4 e t_5 a 45 °C). O valor médio máximo de formas curtas suspeitas foi 5 em SB+AS-20- t_1 e 6 em SB+AS-45- t_4 , o de leveduras isoladas foi 2 em SB+AS-20- t_6 e 2 em SB+AS-45- t_6 , e o de bactérias bastonetes foi 2 em SB+AS-20- t_5 e 2 nos tempos t_1 e t_6 , a 45 °C (Figura 8 e Figura 9). Nas amostras guardadas à temperatura ambiente, verificou-se um maior número de bactérias na segunda metade do ensaio (Figura 8). Nas amostras guardadas na estufa, notou-se um aumento do número de leveduras, na segunda metade do ensaio (Figura 9).

Nas sangrias brancas tratadas com ácido sórbico e dicarbonato de dimetilo (DMDC) apenas as amostras t_0 foram analisadas em duplicado. Verificou-se um aumento de bactérias bastonetes nas amostras armazenadas à temperatura ambiente (Figura 10A).

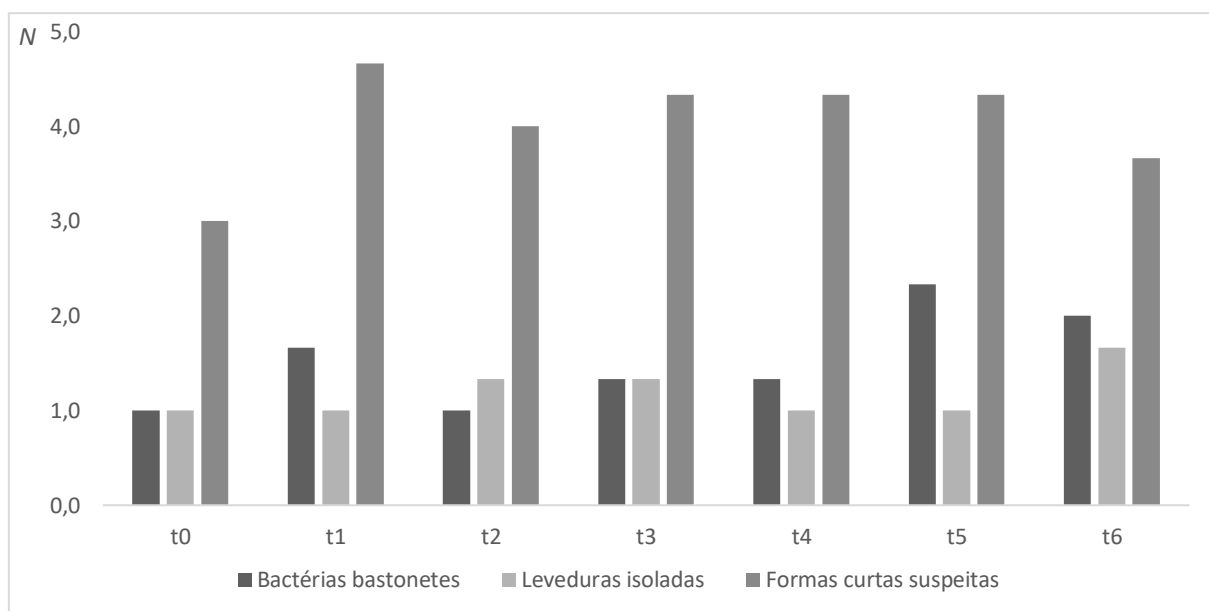


Figura 8. Número médio de bactérias com forma de bastonete, leveduras isoladas e formas curtas suspeitas nas amostras SB+AS-20.

Quanto às amostras armazenadas na estufa, verificou-se um aumento do número de bactérias bastonetes e aumento do número de formas curtas suspeitas ao longo do tempo (Figura 10B).

Nas sangrias de frutos vermelhos tratadas com ácido sórbico, em que não houve amostras em triplicado e apenas as t_0 foram em duplicado, verificou-se um aumento de bactérias bastonetes nas amostras armazenadas à temperatura ambiente (Figura 10C).

Quanto às amostras armazenadas na estufa, verificou-se um aumento do número de bactérias bastonetes. No entanto, relativamente ao número de leveduras isoladas, verificou-se um decréscimo. Porém, devido à falta de amostras em duplicado e em triplicado, bem como a falta dos resultados dos tempos t_1 , t_2 e t_3 , os resultados de microscopia das amostras SB+AS+DMDC e SFV+AS podem não ser significativos (Figura 10D).

Os resultados da análise microscópica demonstram a presença de microrganismos na sangria, embora não permitam confirmar a sua viabilidade, uma vez que o método permite uma contagem celular sem distinção entre células vivas e mortas.

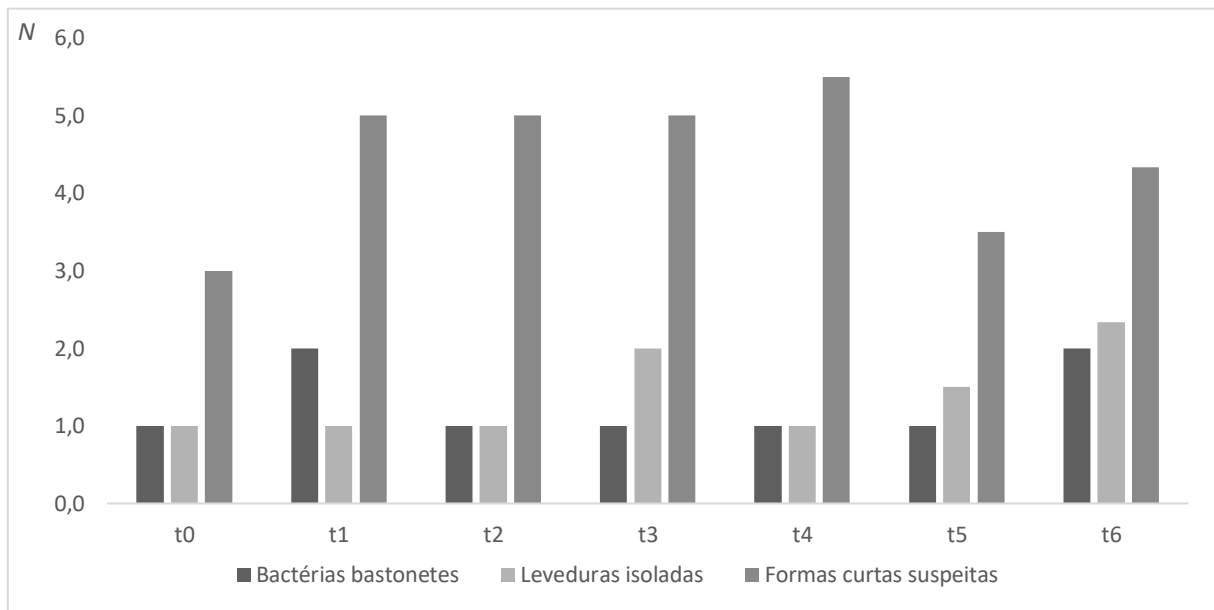


Figura 9. Número médio de bactérias com forma de bastonete, leveduras isoladas e formas curtas suspeitas nas amostras SB+AS-45.

4.1.2. Contagem de microrganismos em meio de cultura

A contagem de microrganismos revelou, duma maneira geral, pouco crescimento microbiano nas sangrias. As amostras SB+AS+DMDC quase não tiveram crescimento. A exceção foi a amostra SB+AS+DMDC-45- t_4 , em que, para as leveduras, o número de *UFC* foi 1. As amostras SFV+AS também apresentaram pouco crescimento. As exceções foram as amostras SFV+AS-20- t_6 e SFV+AS-45- t_1 . Na primeira, registou-se, para as bactérias acéticas (BAC), um número de *UFC* de 4, em 50 mL de amostra. Na segunda registou-se, para as leveduras, um número de *UFC* de 1. As amostras SB+AS foram as que apresentaram maior crescimento e com maior frequência. Neste grupo de amostras, registou-se crescimento no tempo inicial t_0 : para leveduras, um número de *UFC* de 3 e, para BAC, um número de *UFC* de 1. As amostras SB+AS-45 não tiveram crescimento microbiano, enquanto que as amostras SB+AS-20 tiveram crescimento de leveduras em três tempos distintos: t_2 (*UFC* de 4), t_4 (*UFC* de 333) e t_5 (*UFC* de 18) (Tabela 3).

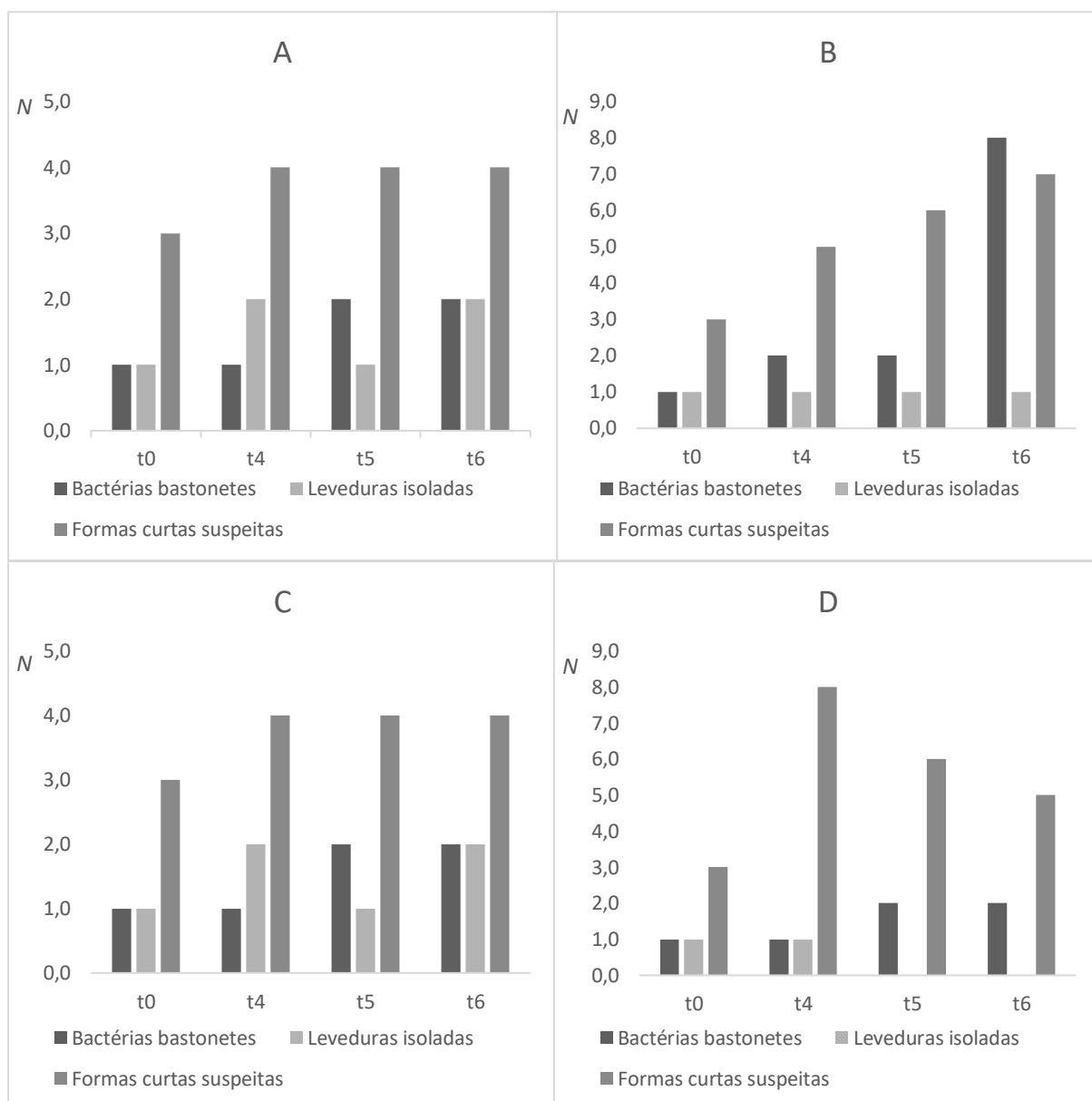


Figura 10. Número médio de bactérias com forma de bastonete, leveduras isoladas e formas curtas suspeitas nas amostras SB+AS+DMDC-20 (A), SB+AS+DMDC-45 (B), SFV+AS-20 (C) e SFV+AS-45 (D).

Não ocorreu, em nenhum momento, crescimento de bolores nas sangrias, nem crescimento de bactérias lácticas (BAL) nas amostras de sangria de frutos vermelhos. A ausência de crescimento de bolores pode ser justificada pelo tamanho dos mesmos. Os bolores, dos quatro grupos de microrganismos pesquisados, são os maiores e, conseqüentemente, os mais facilmente retidos pela microfiltração que é aplicada na produção das sangrias.

Como já referido anteriormente, as amostras SB+AS foram as que obtiveram maior crescimento microbiano, especialmente crescimento de leveduras nas amostras armazenadas à temperatura

ambiente. No caso dessas leveduras, ou parte dessas leveduras serem *S. cerevisiae*, é possível que viesse a ocorrer refermentação como consequência do seu crescimento. No caso de haver leveduras deteriorantes, é provável que surjam defeitos organoléticos no produto. É possível que tenha ocorrido crescimento de leveduras pela ausência de DMDC nestas amostras. Num ensaio feito com vinhos secos, com cerca de 12 % de etanol e pH de 3,50 foi demonstrada a eficácia do DMDC contra o crescimento de leveduras. Para um número de *UFC* de 500 *UFC* em 1 mL, a concentração mínima inibitória de DMDC para as espécies *Schizosaccharomyces pombe*, *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Phicia guilliermondii* foi 100 mg/L. *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygoascus hellenicus* e *Lachancea thermotolerans* mostraram ser mais sensíveis a este conservante, uma vez que foram inibidas com apenas 25 mg/L (Costa, Barata, Malfeito-Ferreira, & Loureiro, 2008).

Contudo, os números não apresentam uma evolução de crescimento típica, visto que o crescimento de leveduras ocorreu intercaladamente nos diferentes tempos de armazenamento. Relativamente às amostras SB+AS-20, ocorreu crescimento nos tempos t_0 , t_2 , t_4 e t_5 , mas não nos tempos t_1 , t_3 nem t_6 . Em SB+AS-20- t_5 registou-se um valor de *UFC* de 333, o mais alto neste estudo. No entanto, foi precedido por um valor de *UFC* de 0 e sucedido por um valor de *UFC* de 18 e por outro de 0 (Tabela 3). Tendo em conta o valor inicial de colónias de leveduras (número de *UFC* de 3) e, se realmente ocorresse crescimento, o seu número deveria, na teoria, aumentar ao longo do tempo. E isso não se verificou nestes resultados. Uma possível justificação para estes valores é a contaminação das placas de cultura durante qualquer fase do método. Trata-se de uma técnica que requiere um ambiente asséptico, que nem sempre se consegue garantir. Outro facto que não alinha com este crescimento nas amostras armazenadas à temperatura ambiente é a ausência de crescimento de leveduras nas amostras armazenadas na estufa.

Nos outros dois grupos de amostras não houve crescimento na maioria dos tempos de armazenamento e, nos que houve, o crescimento foi baixo, enquanto que no grupo de amostras SB+AS, o crescimento foi mais frequente e, em geral, maior. No caso das sangrias brancas, isto pode refletir maior eficácia de preservação do produto com a utilização da combinação do ácido sórbico e o DMDC em relação à utilização do ácido sórbico, isoladamente. Costa, Barata, Malfeito-Ferreira e Loureiro (2008), demonstraram que as BAL e as BAc não são inibidas pelo DMDC, mesmo em concentrações acima do limite legal de 200 mg/L. Posto isto, a administração de ácido sórbico, em combinação com o DMDC, e adição típica de SO_2 pode ser uma mais-valia para impedir o crescimento de leveduras, BAL e BAc nas sangrias. No caso da sangria de frutos vermelhos, isto pode significar que este produto tem um meio quimicamente mais hostil para o

desenvolvimento de microrganismos do que a sangria branca. A sua caracterização química mostra que a sua acidez total, como ácido tartárico (6,90 g/L), é mais alta do que a acidez total, como ácido tartárico, da sangria branca (6,00 g/L) (Tabela 3).

Contudo, é importante salientar a existência de determinados fatores que podem ter influenciado a significância dos resultados obtidos. Uma vez que as amostras foram enviadas para o IVDP, não houve controlo sobre a data das análises, podendo estas terem ocorrido com atrasos, devido a transporte, por exemplo. Algumas amostras que foram enviadas para o IVDP saíram da Aveleda S.A. com atraso de alguns dias devido a uma elevada carga de trabalho no laboratório. Devido a mau planeamento em relação à recolha e armazenamento de amostras e ao espaço disponível limitado nas estufas, não se analisaram todas as amostras em duplicado ou triplicado. Isto tornou o número de amostras menor do que aquele que seria ideal, podendo o tamanho da amostra não ser representativo o suficiente.

4.2. Análises químicas

A determinação da concentração do ácido sórbico permitiu complementar o estudo da estabilidade microbiológica das sangrias, dando uma melhor noção da constituição da sangria branca e permitiu a comparação com o valor de concentração máximo legal deste conservante.

4.2.1. Concentração do ácido sórbico

As concentrações de ácido sórbico nas amostras SB+AS, determinadas por HPLC, foram 130 mg/L e 132 mg/L (Anexo II – Figuras II.1 e II.2), com uma média de $(131 \pm 1,4)$ mg/L. Segundo o Regulamento (CE) n.º 606/2009, o limite máximo de concentração de ácido sórbico permitido em produtos vitivinícolas é de 200 mg/L. Por comparação dos valores pode confirmar-se que este conservante foi usado em concentrações legais, com uma margem de mais de 60 mg/L.

Os valores obtidos, internamente por espectrofotometria, foram 129 mg/L, 145 mg/L e 136 mg/L de ácido sórbico nas amostras SB+AS (Anexo III – Tabela III.), com uma média de $(136,7 \pm 8,0)$ mg/L. Uma vez que são próximos, o valor obtido por HPLC reforçou o valor determinado por este método. Por comparação ao limite legal de ácido sórbico em produtos vitivinícolas de 200 mg/L, este resultado também confirma que o conservante foi usado em concentrações legais, com uma margem de mais de 60 mg/L.

Tabela 3. Resultados do crescimento microbiológico, em número de *UFC*, em 100 mL, salvo exceções, em todos os tempos de análise. As amostras t_0 são as mesmas nas diferentes temperaturas (20 °C e 45 °C). a – Número de *UFC* em 50 mL.

Amostras	Microrganismos	t_0	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6
SB+AS-20	Bolores	0	0	0	0	0	0	0
	Leveduras	3	0	4	0	333	18	0
	BAC	1	0	0	0	0	0	0
SB+AS-45	Bolores	0	0	0	0	0	0	0
	Leveduras	3	0	0	0	0	0	0
	BAC	1	0	0	0	0	0	0
SB+AS+DMDC-20	Bolores	0	0	0	0	0	0	0
	Leveduras	0	0	0	0	0	0	0
	BAC	0	0	0	0	0	0	0
SB+AS+DMDC-45	Bolores	0	0	0	0	0	0	0
	Leveduras	0	0	0	0	1	0	0
	BAC	0	0	0	0	0	0	0
SFV+AS-20	Bolores	0	0	0	0	0	0	0
	Leveduras	0	0	0	0	0	0	0
	BAC	0	0	0	0	0	0	4 ^a
	BAL	-	0	0	0	0	0	0
SFV+AS-45	Bolores	0	0	0	0	0	0	0
	Leveduras	0	1	0	0	0	0	0
	BAC	0	0	0	0	0	0	0
	BAL	-	0	0	0	0	0	0

5. Conclusões e perspectivas de trabalho

Este trabalho teve como objetivo principal a estabilização microbiológica das sangrias branca e de frutos vermelhos, através da determinação da eficácia de diferentes conservantes nestes produtos. Esta foi determinada a partir de exames microbiológicos. Como complemento, foi determinada a concentração de ácido sórbico na sangria branca.

O exame de microscopia demonstrou a presença de bactérias e leveduras nas sangrias brancas e de frutos vermelhos. No entanto, este tipo de exame não permite confirmar a viabilidade e vitalidade celular, pelo que estes parâmetros foram avaliados através das técnicas de cultura de microrganismos.

A cultura de microrganismos em placas revelou a inexistência de crescimento de bolores nas sangrias e de bactérias do ácido láctico na sangria de frutos vermelhos. O crescimento de bactérias acéticas ocorreu poucas vezes e, quando ocorreu, a sua concentração populacional foi muito baixa. Isto pode indicar que os produtos estão microbiologicamente estáveis relativamente a estes tipos de microrganismos. A sangria branca contendo ácido sórbico apresentou maior crescimento microbiológico do que as outras amostras, principalmente, crescimento de leveduras. Pela determinação da concentração de ácido sórbico nestas amostras, pode-se inferir que 131 mg/L deste conservante, sem o uso de DMDC, pode não ser suficiente para garantir estabilidade microbiológica na sangria branca. A sangria branca tratada com ácido sórbico e DMDC e a sangria de frutos vermelhos com ácido sórbico apresentaram muito pouco crescimento, o que pode indicar a estabilidade microbiológica destes produtos. Por comparação dos dois conjuntos de amostras de sangria branca, pode-se concluir que o uso dos conservantes combinados (ácido sórbico e DMDC) pode levar a uma maior estabilidade microbiológica do produto. No entanto, é preciso ter em conta que nem todas as amostras foram em duplicado ou triplicado, pelo que as conclusões do trabalho podem não representar bem a realidade da dinâmica microbiológica nas sangrias.

Como trabalho futuro neste tema, seria interessante estudar o crescimento microbiológico (bolores, leveduras, bactérias acéticas e bactérias do ácido láctico) em amostras de sangrias branca e de frutos vermelhos com diferentes concentrações e combinações de ácido sórbico, DMDC e SO_2 de forma a determinar os limites mínimos de concentração necessários para inibir o crescimento microbiano e obter um produto microbiologicamente estável. Se tal fosse determinado, o uso destes compostos podia ser minimizado, tornando o consumo de sangrias menos prejudicial para a saúde humana e reduzindo o custo do seu fabrico.

Ainda sobre o tema da estabilidade microbiológica, seria interessante um ou vários estudos sobre o uso de métodos de preservação alternativos em sangrias ou até mesmo em vinhos. Existem métodos de preservação alternativos químicos (bacteriocinas, *yeast killer toxins*, péptidos antimicrobianos, etc.) e físicos (alta pressão, ultrassom, campo elétrico pulsado, etc.) cujo efeito de preservação tem apresentado resultados promissores no setor vitivinícola. Estes têm como objetivo comum a redução do uso dos típicos conservantes químicos de modo a produzir um impacto positivo na saúde humana e, no caso da redução do SO₂, permitir às pessoas que são alérgicas a este conservante o consumo de produtos vitivinícolas.

Por fim, pode-se sugerir a implementação de métodos para quantificação da carga microbiológica alternativos mais rápidos e eficazes do que a cultura em placas, como o qPCR celular ou o microarranjo de oligonucleótidos de modo a obter um poder de resposta mais eficiente para problemas microbiológicos. Estas técnicas podem permitir melhor resolução de vários problemas deste tipo nos produtos da empresa, nomeadamente, as sangrias. Tendo em conta a dimensão da empresa, a enorme distribuição dos seus produtos, quer a nível nacional, quer a nível internacional, e a quantidade de clientes que serve e tem de satisfazer, estes métodos podem ser uma mais valia para a continuidade e aumento do sucesso da Aveleda S.A.

Referências bibliográficas

- Ashurst, P. R., Hargitt, R., & Palmer, F. (2017). Microbiological Problems. Em P. R. Ashurst, R. Hargitt, & F. Palmer, *Soft Drink and Fruit Juice Problems Solved*. Woodhead Publishing.
- Aveleda S.A. (2018). Obtido de Aveleda: www.aveleda.com/pt (consultado no dia 20/12/18)
- Ayto, J. (2012). *The Dinner's Dictionary: Word Origins of Food and Drink* (2.^a ed.). Oxford University Press.
- BBC News. (2017). "World's oldest wine" found in 8,000-year-old jars in Georgia. *BBC News*.
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., & Kunkee, R. (1996). *Principles and Practices of Winemaking*. Springer.
- Caballero, B., Finglas, P., & Toldra, F. (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*.
- Castro-Swinski, S. (2018). *Microbial models: from environmental to industrial sustainability*. Springer Verlag, Singapor.
- Cimaglia, F., Tristezza, M., Saccomanno, A., & Grieco, F. (2017). An innovative oligonucleotide microarray to detect spoilage microorganisms in wine. *Food Control*, 87, 169-179.
- Conterno, L., Fondazione, E., & Henick-Kling, T. (2010). Brettanomyces/Dekkera off-flavours and other wine faults associated with microbial spoilage. Em A. Reynolds, *Managing Wine Quality* (pp. 346-387). Woodhead Publishing.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*.
- Curvelo-Garcia, A., & Barros, P. (2015). Química enológica - métodos analíticos.
- Dias Cardoso, A. (2007). *O Vinho - da uva à garrafa*. Âncora Editora.
- Drysdale, G., & Fleet, G. (1989). The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*.
- Esteve-Zarzoso, B., Martínez, M., Rubires, X., Yuste-Rojas, M., & Torres, M. (2011). Applied Wine Microbiology. Em A. C. Santiago, R. Munoz, & R. G. Garcia, *Molecular Wine Microbiology*.
- Fleet, G. H. (1993). *Wine Microbiology and Biotechnology*. CRC Press.
- Gammon, D. W., Moore, T. B., & O'Malley, M. A. (2010). A Toxicological Assessment of Sulfur as a Pesticide. Em R. Krieger, *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1889-1901). Elsevier.
- Hames, G. (2012). *Alcohol in world history*. London: Routledge.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology*. Springer.
- Jorge, K. (2003). Soft Drinks : Chemical Composition. Em B. Caballero, P. Finglas, & F. Toldra, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press.
- Joslyn, M., & Braverman, J. (1954). The Chemistry and Technology of the Pretreatment and Preservation of Fruit and Vegetable Products with Sulfur Dioxide and Sulfites.

- König, H., Unden, G., & Fröhlich, J. (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*.
- Kurtzman, C., & James, S. (2006). *Zygosaccharomyces and related genera*. Em C. de Blackburn, *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing.
- Lanxess. (2009). Velcorin® - uma boa escolha para vinhos.
- Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., & Alexandre, H. (2016). Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiology*.
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage : Yeasts in Spoilage. Em B. Caballero, P. Finglas, & F. Toldra, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press.
- McGovern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M. P., & Smith, K. E. (2017). Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus.
- OIV. (2018). *International Code of Oenological Practices. International Organisation of Vine and Wine*.
- Pardo, I., Mendes-Ferreira, A., Ferrer, S., & Mendes Faia, A. (2015). Controlo microbiológico de mostos e vinhos. Em A. Curvelo-Garcia, & P. Barros, *Química Enológica – métodos analíticos*.
- Ramis-Ramos, G. (2003). Antioxidants : Synthetic Antioxidants, Characterization and Analysis. Em B. Caballero, P. Finglas, & F. Toldra, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academy Press.
- Regulamento (CE) n.º 606/2009. (s.d.). 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 (...). *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Regulamento (UE) n.º 251/2014. (2014). Regulamento (UE) n.º 251/2014 do Parlamento Europeu e do Conselho de 26 de fevereiro de 2014 relativo à definição, descrição, apresentação, rotulagem (...) dos produtos vitivinícolas aromatizados, e que revoga o Regulamento (CEE) n.º 1601/91 do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, 14-34.
- Regulamento Delegado (UE), 2. (2019). Regulamento Delegado (UE) 2019/33 da Comissão de 17 de outubro de 2018 que complementa o Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho no respeitante aos pedidos de proteção das denominações de origem (...) à rotulagem e apresentação. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Ribéreau Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006b). *Handbook of Enology, vol. 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006a). *Handbook of Enology, vol. 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*.
- Santos, V., Pardo, I., & Ferrer, S. (2017). Improved detection and enumeration of yeasts in wine by Cells-qPCR. *Food Science and Technology*.
- Stevenson, D., & Simon, R. (1981). Sensitivity to ingested metabisulfites in asthmatic subjects.
- Threlfall, R., & Morris, J. (2002). Using dimethyldicarbonate to minimize sulfur dioxide or prevention of fermentation from excessive yeast contamination in juice and semi-sweet wine.

Tiziana Lisanti, M., Blaiotta, G., Nioi, C., & Moio, L. (2019). Alternative Methods to SO₂ for Microbiological Stabilization of Wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.

Anexos

Anexo I – Exemplos de boletins dos resultados dos exames microbiológicos

Anexo II – Boletins dos resultados dos exames de HPLC para a determinação do ácido sórbico

Anexo III – Exemplo de cálculo da determinação da concentração do ácido sórbico por espectrofotometria

Anexo I – Exemplos de boletins dos resultados dos exames microbiológicos

 <p>Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território</p>	 <p>IVDP, I. P. Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I.P.</p>		
<p>LABORATÓRIO DO INSTITUTO DOS VINHOS DO DOURO E DO PORTO - BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA</p>			
<p>N.º Processo: 2019/02814/01 Data Recepção: 2019/07/30 Ref: BX20T5.1 Pag. 1/1</p>			
<p>Produto: 08 Vinho Aromatizado Categoria Produto:</p>	<p>Finalidade: 05 Assistência Laboratorial Registo:</p>		
<p>Entidade: 5002638840 AVELEDA, S.A. RUA DA AVELEDA, 2 4560-570 PENAFIEL</p>			
<p>6251-EXAME MICROSCÓPICO (OIVAS4-1:10 *)</p>			
<p>Bactérias</p>			
(0)cocos	(0)bactérias curtas (2)bastonetes (0)filamentos bacterianos		
<p>Leveduras</p>			
(1)isoladas	(0)grupos (0)cadeia		
<p>Fungos</p>			
(0)hifas	(0)esporos		
<p>Formas Curtas Suspeitas</p>			
(4)formas curtas suspeitas			
<p>Detritos</p>			
(3)agregados	(2)com matéria corante		
<p>Cristais</p>			
(4)lamelares	(1)prismáticos (0)agulha		
<p>Apreciação Exame Microscópico Resultado: NORMAL COM RESERVAS</p>			
<p>EXAME MICROBIOLÓGICO</p>			
6281 Bolores	: < 1,0 UFC/100 ml aos 05 dias (membrana de 0,45 µm). (OIVAS4-1:10 *)		
6291 Leveduras	: 5,3x10 UFC/100 ml aos 05 dias (membrana de 0,45 µm). (OIVAS4-1:10 *)		
6261 Bactérias acéticas	: < 1,0 UFC/100 ml aos 12 dias (membrana de 0,22 µm). (OIVAS4-1:10 *)		
<p>Apreciação Exame Microbiológico Registou-se o desenvolvimento de leveduras no meio de cultura nutritivo utilizado. Não se registou o desenvolvimento de bolores e bactérias acéticas nos meios de cultura nutritivos utilizados.</p>			
<p>Data Conclusão: 2019/09/09  Director dos Serviços Técnicos e Certificação</p>			
<p>Legenda de Exame Microscópico/Microbiológico: (0)-Não Observado(1)-Raros(2)-Poucos(3)-Alguns(4)-Alguns Freq.(5)-Frequentes(6)-Muito Freq.(7)-Numerosos(8)-Numerosíssimos UFC - Unidades Formadoras de Colónias Não é permitida a reprodução deste documento, sem autorização expressa da Direcção de Serviços Técnicos, excepto quando feita na íntegra. A amostragem é da responsabilidade do cliente. Os resultados inscritos correspondem exclusivamente à amostra analisada e foram produzidos entre a data de recepção e de conclusão do processo. As designações e referências mencionadas são da exclusiva responsabilidade do cliente. O Laboratório do IVDP, com Acreditação IPAC N.º L0115, e a Câmara de Provedores do IVDP, com Acreditação IPAC N.º L0235, são entidades que integram a Direcção de Serviços Técnicos. * - Método não englobado no âmbito da acreditação // @ - Análise subcontratada com ensaio acreditado. § - Análise subcontratada com ensaio não acreditado MIVDP-Método Interno // ME-Método Externo // LQ-Limite de Quantificação // LD-Limite de detecção// LL-Limite Legal OIV-AS: Compêndio dos Métodos Internacionais de Análise dos Vinhos e Mostos de 2013 OIV-BS: Compêndio dos Métodos Internacionais de Análise de Bebidas Espirituosas de Origem Vitivinícola de 2013. O sistema de certificação aplicável é o Sistema 4, excepto a alínea d) do ponto 6, do ISO Guide 67.</p>			
<p>Rua dos Camilhos, 90 5050 - 272 Peso da Régua</p>	<p>T. 254 320 130 F. 254 320 149</p>	<p>www.ivdp.pt e-mail: ivdp@ivdp.pt</p>	<p>Rua Ferreira Borges 4050 - 253 Porto T. 22 207 16 00 F. 22 207 16 99 Contribuinte 501 176 080</p>

Figura I.1. Boletim do resultado microbiológica duma amostra SB+AS-20-t5.



Ministério da Agricultura,
do Mar, do Ambiente e do
Ordenamento do Território



IVDP, I. P.
Instituto dos Vinhos
do Douro e do Porto, I.P.

LABORATÓRIO DO INSTITUTO DOS VINHOS DO DOURO E DO PORTO – BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Nº Processo: 2019/02054/01 Data Receção: 2019/05/29 Ref: BZ45T6

Pag. 1/1

Produto: 08 Vinho Aromatizado Finalidade: 05 Assistência Laboratorial
Categoria Produto: Registo:

Entidade: 5002638840 AVELEDA, S.A.
RUA DA AVELEDA, 2
4560-570 PENAFIEL

6251-EXAME MICROSCÓPICO (OIVAS4-1:10 *)

Bactérias			
(0)cocos	(0)bactérias curtas	(8)bastonetes	(0)filamentos bacterianos
Leveduras			
(1)isoladas	(0)grupos	(0)cadeia	
Fungos			
(0)hifas	(0)esporos		
Formas Curtas Suspeitas			
(7)formas curtas suspeitas			
Detritos			
(3)agregados	(2)com matéria corante		
Cristais			
(5)lamelares	(1)prismáticos	(1)agulha	

Apreciação Exame Microscópico

Resultado: ANORMAL

EXAME MICROBIOLÓGICO

6281 Bolores	: < 1,0	UFC/050 ml aos 12 dias (membrana de 0,45 µm).	(OIVAS4-1:10 *)
6291 Leveduras	: < 1,0	UFC/050 ml aos 12 dias (membrana de 0,45 µm).	(OIVAS4-1:10 *)
6261 Bactérias acéticas	: < 1,0	UFC/050 ml aos 12 dias (membrana de 0,22 µm).	(OIVAS4-1:10 *)
6271 Bactérias lácticas	: < 1,0	UFC/050 ml aos 12 dias (membrana de 0,22 µm).	(OIVAS4-1:10 *)

Apreciação Exame Microbiológico

Não se registou o desenvolvimento de bolores, leveduras, bactérias acéticas e lácticas, nos meios de cultura nutritivos utilizados.

Data Conclusão: 2019/06/11  Director dos Serviços Técnicos e Certificação

Legenda de Exame Microscópico/Microbiológico:

(0)-Não Observado(1)-Raros(2)-Poucos(3)-Alguns(4)-Alguns Freq.(5)-Frequentes(6)-Muito Freq.(7)-Numerosos(8)-Numerosíssimos
UFC - Unidades Formadoras de Colónias

Não é permitida a reprodução deste documento, sem autorização expressa da Direcção de Serviços Técnicos, excepto quando feita na íntegra. A amostragem é da responsabilidade do cliente. Os resultados inscritos correspondem exclusivamente à amostra analisada e foram produzidos entre a data de receção e de conclusão do processo. As designações e referências mencionadas são da exclusiva responsabilidade do cliente. O Laboratório do IVDP, com Acreditação IPAC N.º L0115, e a Câmara de Provedores do IVDP, com Acreditação IPAC N.º L0235, são entidades que integram a Direcção de Serviços Técnicos.

* - Método não englobado no âmbito da acreditação // @ - Análise subcontratada com ensaio acreditado.

§ - Análise subcontratada com ensaio não acreditado

MIVDP-Método Interno // ME-Método Externo // LQ-Limite de Quantificação // LD-Limite de detecção// LL-Limite Legal

OIV-AS: Compendio dos Métodos Internacionais de Análise dos Vinhos e Mostos de 2013

OIV-BS: Compendio dos Métodos Internacionais de Análise de Bebidas Espirituosas de Origem Vitivinícola de 2013.

O sistema de certificação aplicável é o Sistema 4, excepto a alínea d) do ponto 6, do ISO Guide 67.

Rua dos Camilos, 90
5050 - 272 Peso da Régua

T. 254 320 130
F. 254 320 149

www.ivdp.pt
e-mail:
ivdp@ivdp.pt

Rua Ferreira Borges
4050 - 253 Porto

T. 22 207 16 00
F. 22 207 16 99

Contribuinte
501 176 080

Figura I.2. Boletim do resultado microbiológico da amostra SB+AS+DMDC-45-t₆.



Ministério da Agricultura,
do Mar, do Ambiente e do
Ordenamento do Território



IVDP, I. P.
Instituto dos Vinhos
do Douro e do Porto, I.P.

LABORATÓRIO DO INSTITUTO DOS VINHOS DO DOURO E DO PORTO - BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Nº Processo:2018/03728/01 Data Recepção:2018/11/26 Ref:RXT020

Pag.1/1

Produto: 08 Vinho Aromatizado
Categoria Produto:

Finalidade: 05 Assistência Laboratorial
Registo:

Entidade: 5002638840 AVELEDA, S.A.
RUA DA AVELEDA, 2
4560-570 PENAFIEL

6251-EXAME MICROSCÓPICO (OIVAS4-1:10 *)

Bactérias

(0)cocos (0)bactérias curtas (1)bastonetes (0)filamentos bacterianos

Leveduras

(1)isoladas (0)grupos (0)cadeia

Fungos

(0)hifas (0)esporos

Formas Curtas Suspeitas

(3)formas curtas suspeitas

Detritos

(2)agregados (0)com matéria corante

Cristais

(7)lamelares (0)prismáticos (0)agulha

Apreciação Exame Microscópico

Resultado: NORMAL

EXAME MICROBIOLÓGICO

6281 Bolores : < 1,0 UFC/100 ml aos 10 dias (membrana de 0,45 µm). (OIVAS4-1:10 *)

6291 Leveduras : < 1,0 UFC/100 ml aos 10 dias (membrana de 0,45 µm). (OIVAS4-1:10 *)

6261 Bactérias acéticas : < 1,0 UFC/100 ml aos 10 dias (membrana de 0,22 µm). (OIVAS4-1:10 *)

Apreciação Exame Microbiológico

Não se registou o desenvolvimento de bolores, leveduras e bactérias acéticas, nos meios de cultura nutritivos utilizados.

Data Conclusão: 2018/12/10 Director dos Serviços Técnicos e Certificação

Legenda de Exame Microscópico/Microbiológico:

(0)-Não Observado(1)-Raros(2)-Poucos(3)-Alguns(4)-Alguns Freq.(5)-Frequentes(6)-Muito Freq.(7)-Numerosos(8)-Numerosíssimos
UFC - Unidades Formadoras de Colónias

Não é permitida a reprodução deste documento, sem autorização expressa da Direcção de Serviços Técnicos, excepto quando feita na íntegra. A amostragem é da responsabilidade do cliente. Os resultados inscritos correspondem exclusivamente à amostra analisada e foram produzidos entre a data de recepção e de conclusão do processo. As designações e referências mencionadas são da exclusiva responsabilidade do cliente. O Laboratório do IVDP, com Acreditação IPAC N.º L0115, e a Câmara de Provedores do IVDP, com Acreditação IPAC N.º L0235, são entidades que integram a Direcção de Serviços Técnicos.

* - Método não englobado no âmbito da acreditação // @ - Análise subcontratada com ensaio acreditado.

§ - Análise subcontratada com ensaio não acreditado

MIIVDP-Método Interno // ME-Método Externo // LQ-Limite de Quantificação // LD-Limite de detecção// LL-Limite Legal

OIV-AS: Compêndio dos Métodos Internacionais de Análise dos Vinhos e Mostos de 2013

OIV-B5: Compêndio dos Métodos Internacionais de Análise de Bebidas Espirituosas de Origem Vitivinícola de 2013.

O sistema de certificação aplicável é o Sistema 4, excepto a alínea d) do ponto 6, do ISO Guide 67.

Rua dos Camilhos, 90
5050 - 272 Peso da Régua

T. 254 320 130
F. 254 320 149

www.ivdp.pt
e-mail:
ivdp@ivdp.pt

Rua Ferreira Borges
4050 - 253 Porto

T. 22 207 16 00
F. 22 207 16 99

Contribuinte
501 176 080

Figura I.3. Boletim do resultado microbiológico da amostra SFV+AS-t₀.

Anexo II – Boletins dos resultados das concentrações de ácido sórbico, por HPLC

 REPÚBLICA PORTUGUESA <small>AGRICULTURA, FLORESTAS E DESENVOLVIMENTO RURAL</small>	 INSTITUTO DOS VINHOS DO DOURO E DO PORTO, I.P.	 IPAC <small>accreditation</small> L0115 H0001 17025 (Início)	Emitido em: 2019-05-31 17:01:33 (Versão 1)  <small>Bento Amaral Diretor dos Serviços Técnicos e de Certificação</small> Lote: -		
N.º Processo: 2019/02364/01 Data Receção: 2019/05/28 V.Ref.: BX20T3 Página 1 de 1					
***** BOLETIM DE ANÁLISE LABORATORIAL *****					
Produto: 10 Vinho sem DO/IG Colheita: - Cat. Produto: VINHO		Finalidade: 10 Assistencia Laboratorial N.º Registo: - Cor: Branco			
<hr/> Entidade: 5002638840 AVELEDA, S.A. AVELEDA RUA DA AVELEDA, 2 4560-570 PENAFIEL - PORTUGAL					
Resultados de Análise Laboratorial					
Cod	Designação do Parâmetro	Resultado	Unidade	Método	Data
30 2	Ácido Sórbico	132	mg/dm ³	MIVDP73-05	2019/05/31
Data de Conclusão: 2019/05/31				O Diretor de Serviços Técnicos: (Bento Amaral)	
<p>Não é permitida a reprodução deste documento, sem autorização expressa da Direcção de Serviços Técnicos, excepto quando feita na íntegra.</p> <p>A amostragem é da responsabilidade do cliente. Os resultados inscritos correspondem exclusivamente à amostra analisada e foram produzidos entre a data de receção e de conclusão do processo.</p> <p>As designações e referências mencionadas são da exclusiva responsabilidade do cliente.</p> <p>O Laboratório do IVDP (L0115) e a Câmara de Provedores (L0235) integram a Direcção de Serviços Técnicos e de Certificação e estão acreditados pelo IPAC, segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025.</p> <p>* - Método não englobado no âmbito da acreditação // @ - Análise subcontratada com ensaio acreditado § - Análise subcontratada com ensaio não acreditado MIVDP-Método Interno//ME-Método Externo//LQ-Limite de Quantificação//LD-Limite de Detecção//LL-Limite Legal//LC-Limite Convencionado OIV-AS: Compêndio dos Métodos Internacionais de Análise dos Vinhos e Mostos, em vigor. OIV-BS: Compêndio dos Métodos Internacionais de Análise de Bebidas Espirituosas de Origem Vitivinícola, em vigor. O algoritmo utilizado nos cálculos subjacentes a um resultado de ensaio em que constem valores inferiores ao limite de quantificação está descrito no respectivo método. Nota 1: MIVDP 89-04 equivalente a OIVAS13-01:2015 Nota 2: MIVDP 32-03 equivalente a OIVAS321-02:2009</p>					

Figura II.1. Boletim do resultado HPLC para a determinação da concentração de ácido sórbico nas amostras SB+AS.

**** BOLETIM DE ANÁLISE LABORATORIAL ****

Produto: 10 Vinho sem DO/IG Finalidade: 10 Assistencia Laboratorial Nº Registo: -
Colheita: - Cor: Branco
Cat. Produto: VINHO

Entidade: 5002638840 AVELEDA, S.A.
AVELEDA
RUA DA AVELEDA, 2
4560-570 PENAFIEL - PORTUGAL

Resultados de Análise Laboratorial

Cod	Designação do Parâmetro	Resultado	Unidade	Método	Data
30 2	Ácido Sórbico	130	mg/dm ³	MIVDP73-05	2019/06/27

Data de Conclusão: 2019/06/27 O Diretor de Serviços Técnicos: (Bento Amaral)

Este documento anula e substitui a versão 1 previamente emitido em 27/06/2019 às 16:33.

Não é permitida a reprodução deste documento, sem autorização expressa da Direcção de Serviços Técnicos, excepto quando feita na íntegra.

A amostragem é da responsabilidade do cliente. Os resultados inscritos correspondem exclusivamente à amostra analisada e foram produzidos entre a data de recepção e de conclusão do processo.

As designações e referências mencionadas são da exclusiva responsabilidade do cliente.

O Laboratório do IVDP (L0115) e a Câmara de Provedores (L0235) integram a Direcção de Serviços Técnicos e de Certificação e estão acreditados pelo IPAC, segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025.

* - Método não englobado no âmbito da acreditação // @ - Análise subcontratada com ensaio acreditado

§ - Análise subcontratada com ensaio não acreditado

MIVDP-Método Interno//ME-Método Externo//LQ-Limite de Quantificação//LD-Limite de Detecção//LL-Limite Legal//LC-Limite Convencionado

OIV-AS: Compêndio dos Métodos Internacionais de Análise dos Vinhos e Mostos, em vigor.

OIV-BS: Compêndio dos Métodos Internacionais de Análise de Bebidas Espirituosas de Origem Vitivinícola, em vigor.

O algoritmo utilizado nos cálculos subjacentes a um resultado de ensaio em que constem valores inferiores ao limite de quantificação está descrito no respectivo método.

Nota 1: MIVDP 89-04 equivalente a OIVAS313-01:2015

Nota 2: MIVDP 32-03 equivalente OIVAS321-02:2009

Figura II.2. Boletim do resultado HPLC para a determinação da concentração de ácido sórbico nas amostras SB+AS.

Anexo III – Exemplo de cálculo da determinação da concentração do ácido sórbico por espectrofotometria

Tabela III.1. Valores de absorvância a 256 nm (Abs_{256}), concentração (C) final, com aplicação do fator de diluição de 1000. Valores obtidos através da Equação 1.

Abs_{256}	$C/(mg/L)$
0,0191	129
0,0226	145
0,0206	136

Os valores da concentração foram determinados por cálculo, usando os valores de absorvância (Tabela III.1) e a equação da reta de calibração (Equação 1, secção 3.2.2.). Serve de exemplo, para a absorvância 0,0191:

$$Abs_{256} = \left(0,2222 \times \frac{C}{mg/L} - 0,0096 \right) \Leftrightarrow$$

$$\frac{C}{mg/L} = \frac{Abs_{256\ nm} + 0,0096}{0,2222} \Leftrightarrow$$

$$\frac{C}{mg/L} = \frac{0,0191 + 0,0096}{0,2222} \Leftrightarrow$$

$$\frac{C}{mg/L} = 0,129$$

Tendo em conta o fator de diluição (1000), tem-se que:

$$\frac{C}{mg/L} = 0,129 \times 1000 = 129\ mg/L$$