



**Heitor Rafael Teixeira
Coelho**

**Estabilização microbiológica no pré-
engarrafamento: Um estudo com vista à otimização
do processo de engarrafamento de vinho**



**Heitor Rafael Teixeira
Coelho**

**Estabilização microbiológica no pré-engarrafamento:
Um estudo com vista à otimização do processo de
engarrafamento de vinho**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar com agregação no Departamento de Química e co-orientação da Doutora Ana Maria Lopes Rodrigues Macena, Coordenadora Geral de Operações na Global Wines S.A.

O júri

Presidente/President

Professora Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Martins Leal
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

Arguente/ Arguent

Doutora Maria Paula do Amaral Alegria Guedes de Pinho
Professora Associada Convidada com Agregação, Faculdade de Ciências – Universidade do Porto

Orientador/Supervisor

Professora Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço
Professora auxiliar com agregação, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Agradeço a todos que, de um modo ou de outro, me trouxeram nesta direção e me ajudaram a concluir esta etapa bem como as anteriores. Agradeço ainda de forma especial aos meus pais, ao meu irmão e à Cátia. Foram especialmente eles que me suportaram ao longo do caminho. Quero ainda agradecer à Ana Rodrigues por toda a ajuda, toda a disponibilidade, paciência e acima de tudo pela oportunidade dada. Por fim agradeço a todos os restantes colaboradores da Global Wines por me fazerem sentir integrado na equipa e por toda a ajuda que me deram durante o decorrer do estágio.

palavras-chave

Vinho, engarrafamento, estabilização microbiológica, pasteurização flash, filtração, qualidade alimentar, qualidade organolética

resumo

O vinho, não sendo um bem essencial, acaba por se categorizar num alimento *premium*, do qual é exigido um elevado padrão de qualidade por parte do consumidor. A necessidade de atender às exigências do consumidor e de entregar produtos de qualidade cada vez melhor, leva a Global Wines a ter um forte investimento no setor de inovação e qualidade. Um dos pontos mais críticos em todo o processo de vinificação é o engarrafamento. Este é o estágio de transição entre o produtor e o consumidor e existem inúmeros fatores que podem acabar por reduzir a qualidade do produto. Um dos fatores de risco é a presença de microrganismos de alteração. Embora sejam essenciais para a sua produção, no produto final, estes não podem existir, pois podem acabar por reduzir a qualidade sensorial do vinho. A remoção dos microrganismos pode ser efetuada utilizando diversos mecanismos, tanto físicos como químicos e muitas vezes são até mesmo aplicados mais do que um. Este estudo teve por objetivo a introdução ao contexto empresarial e a otimização do processo de engarrafamento. Neste trabalho será avaliada e otimizada a velocidade de enchimento com vista à obtenção de uma estabilização microbiológica e parâmetros físico-químicos e sensoriais do vinho, apropriados. Avaliou-se ainda a pasteurização *flash* e a filtração como técnicas de estabilização microbiológica com o intuito de avaliar e comparar a sua eficiência e os seus efeitos na evolução das propriedades físico-químicas e sensoriais durante o estágio em garrafa. Estudaram-se os efeitos destas técnicas em amostras de vinho tinto, rosé e branco. Para as amostras de vinho tinto aplicou-se o método de somers, o método da metil-celulose precipitável e o CIELab de modo a determinar as características físico-químicas ao longo do tempo, para estas amostras avaliou-se ainda a presença de bolores, leveduras, bactérias e de *Brettanomyces* e fez-se uma prova sensorial descritiva. Para as amostras de vinho rosé fizeram-se as mesmas análises à exceção do método da metil-celulose precipitável. Para o vinho branco apenas se aplicou o CIELab, as análises microbiológicas e a prova sensorial. No tempo de estudo avaliado não se registaram diferenças significativas na evolução dos parâmetros físico-químicos entre amostras. No final do estudo as únicas diferenças colorimétricas encontradas foram no vinho rosé após 140 dias entre a amostra testemunha e a amostra pasteurizada com enchimento a frio e a amostra filtrada. A nível microbiológico ambas as técnicas aplicadas demonstraram ser eficientes. Já a nível sensorial não foram detetadas quaisquer diferenças significativas entre as amostras. Estes resultados permitiram concluir que a velocidade de enchimento de vinho tinto pasteurizado não apresenta influência sobre as propriedades qualitativas do vinho, o que permite à empresa em questão ter uma produção superior sem afetar o produto final. Quanto aos ensaios comparativos entre as diferentes técnicas de estabilização microbiológica, também não se encontram diferenças significativas entre as amostras. Isto permite concluir que a empresa tanto pode aplicar a pasteurização como a filtração que não irá afetar a qualidade do vinho.

keywords

Wine, bottling, microbial stabilization, flash pasteurization, filtration, food quality, organoleptic quality

abstract

Wine is classified as a premium product, so the consumer expects a high-quality product. The need to meet the consumer demands and the will to always deliver the best product leads Global Wines to have a strong investment in the innovation and quality sectors. One of the critical points in all the steps of winemaking is bottling. This is the last step of the process and stands out by being the transition stage between the producer and the consumer, where numerous factors can end up reducing the wine quality. The presence of wine spoilage microorganisms in the end product is one of them. Although they are essential for the wine production, in the final product, they cannot exist, as they may end up reducing the sensorial quality. The removal of microorganisms can be carried out using several mechanisms, both physical and chemical, and often more than one is applied. This work aims to introduce the industrial environment and to optimize the bottling process of Global Wines. In this work, will be evaluated and optimized different microbiological stabilization methods to obtain a microbiological stabilization and appropriate physical, chemical and sensory parameters of red, rosé and white wine. For the red wine samples, the Somers method, the precipitable methylcellulose method and CIELab were applied in order to determine the physical-chemical characteristics over time. For these samples, it was also evaluated the presence of molds, yeast bacteria and *Brettanomyces*. The sensorial analysis of these samples was made by a descriptive test. For the rosé wine samples, the same analyses were performed, except for the precipitable methylcellulose method. For white wine, only CIELab, microbiological analyses and sensory tests were applied. In this study there were no significant differences in the evolution of physical-chemical parameters between samples. At the end of this study, the only differences found were colorimetric and were found in samples treated with pasteurization and filtrated samples against samples with no microbial stabilization of rosé wines after 140 days. The microbiological analysis showed that for these samples both techniques were effective and the sensorial evaluation didn't find any differences between samples. These results allowed to conclude that the filling speed of pasteurized red wine does not influence the qualitative properties of the wine, which allows an high production without affecting the final product. As for the comparative tests between different microbiological stabilization techniques, there are also no significant differences between the samples. This allows us to conclude that the company can apply both pasteurization or filtration without decreasing the wine quality.

Índice

Índice de Tabelas	i
Índice de Figuras	iii
Enquadramento	1
1. Revisão bibliográfica	1
1.1. Importância económica da indústria vitivinícola	1
1.2. Composição do vinho	3
1.2.1. Composição química	3
1.2.2. Composição microbiológica	6
1.2.3. Microrganismos de deterioração	7
1.3. Estabilização microbiológica de vinhos engarrafados	9
1.3.1. Tratamentos químicos	9
1.3.1.1. Tratamento com dióxido de enxofre	9
1.3.1.2. Tratamento com ácido ascórbico	11
1.3.1.3. Tratamento com ácido sórbico	11
1.3.1.4. Tratamento com dimetildicarbonato (DMDC)	12
1.3.1.5. Tratamento com lisozima	12
1.3.2. Tratamentos físicos	13
1.3.2.1. Pasteurização	13
1.3.2.2. Campos elétricos pulsados (PEF), descargas elétricas de alta voltagem (HVED)	14
1.3.2.3. Radiação ultravioleta	15
1.3.2.4. Ultrassons	16
1.3.2.5. Processamento de alta pressão (HPP) e homogeneização de alta pressão (HPH)	16
1.3.2.6. Filtração	17
1.4. Mecanismos de envelhecimento em garrafa	19
1.4.1. Impacto do envelhecimento na cor	19
1.4.1.1. A cor nos vinhos tintos	19
1.4.1.2. A cor nos vinho brancos	23
1.4.2. Alterações do sabor e do aroma	25
1.5. Engarrafamento	26

1.6. Higienização	28
1.7. Controlo de qualidade dos vinhos	30
2. Objetivos.....	32
3. Metodologia.....	33
3.1. Recolha de amostras	33
3.2. Análises.....	37
3.2.1 Parâmetros físico-químicos gerais	38
3.2.2 Dióxido de enxofre livre (SO ₂ L) e total (SO ₂ T).....	39
3.2.3 Medição da Turbidez e do pH.....	39
3.2.4 Análise dos compostos fenólicos	39
3.2.4.1. Método de Somers (análise dos compostos fenólicos).....	39
3.2.4.2 Método da metil-celulose precipitável (MCP)	40
3.2.4.3 Determinação das características cromáticas	41
3.2.5 Análise microbiológica	42
3.2.6 Análise sensorial	42
3.2.7 - Análise estatística	42
4. Resultados e Discussão	43
4.1. Caracterização dos vinhos	43
4.2 Ensaio comparativo entre velocidades de enchimento, teste aplicado em vinho tinto.....	48
4.2.1. Análise dos compostos fenólicos das amostras referentes ao ensaio comparativo entre velocidades de enchimento	50
4.2.2 Análise da cor das amostras referentes ao ensaio comparativo entre velocidades de enchimento	57
4.2.3 Análise microbiológica das amostras referentes ao ensaio comparativo entre velocidades de enchimento	59
4.2.4. Análise sensorial das amostras referentes ao ensaio comparativo entre velocidades de enchimento	60
4.3 Ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto.	63
4.3.1. Análise dos compostos fenólicos das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto.....	63

4.3.2	Análise da cor das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto.	69
4.3.3.	Análise microbiológica das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto.....	70
4.4	Ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica de vinho rosé.....	71
4.4.1.	Análise dos compostos fenólicos das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé.....	71
4.4.2.	Análise da cor das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé.....	77
4.4.3.	Análise microbiológica das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé.....	78
4.4.4.	Análise sensorial das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé.....	79
4.5	Ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica de vinho branco.....	80
4.5.1.	Análise da cor das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho branco	81
4.5.2.	Análise microbiológica das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho branco	83
4.5.3.	Análise sensorial das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho branco	83
5.	Conclusão	86
5.1.	Trabalho futuro:	87
	Referências Bibliográficas	88
6.	Anexos.....	94
6.1.	Ficha de prova descritiva das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento.....	94
6.2.	Ficha de prova descritiva das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica.....	96
6.3.	Ficha de prova descritiva das amostras de vinho branco envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica.....	98

6.4. Reta de calibração da epicatequina utilizada no método da metil-celulose precipitável.....	100
---	-----

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Leveduras envolvidas na deterioração do vinho (adaptado de: Campaniello e Sinigaglia, 2017).....	8
Tabela 2 - Defeitos provocados por bactérias lácticas (adaptado de: Delanoe et al., 2005).....	8
Tabela 3 - Análises realizadas em cada amostra.....	38
Tabela 4 - Formulas necessárias para calcular o índice de fenóis totais, a intensidade de cor, a tonalidade, os pigmentos poliméricos, o índice de polimerização, as antocianinas totais e coradas, os pigmentos totais e o índice de ionização em vinhos tintos e rosés.	40
Tabela 5 - Caracterização sumária do vinho tinto utilizado no estudo	44
Tabela 6 - Caracterização sumária do vinho rosé utilizado ao longo do estudo.....	44
Tabela 7 - Caracterização sumária do vinho branco utilizado durante o estudo.....	44
Tabela 8: Temperatura atingida pelo vinho tinto em diferentes pontos, desde a pasteurização até ao enchimento.	49
Tabela 9: Diferenças colorimétricas, entre amostras de vinho tinto, obtidas pela técnica de CIELab. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).	58
Tabela 10: Resultados das análises microbiológicas obtidas para vinhos tintos, no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).....	59
Tabela 11: Temperaturas de exposição do vinho, desde o processo de pasteurização até ao seu engarrafamento, durante a recolha das amostras de vinho tinto.	63
Tabela 12: Diferenças colorimétricas, entre amostras de vinho tinto recolhidas aquando do ensaio comparativo entre técnicas de estabilização microbiológica, obtidas pela técnica de	

CIELab. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).69

Tabela 13: Resultados das análises microbiológicas obtidas para vinhos tintos, no ensaio de comparação entre técnicas de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).70

Tabela 14: Temperaturas de exposição do vinho, desde o processo de pasteurização até ao seu engarrafamento, durante a recolha das amostras de vinho rosé.71

Tabela 15: Diferenças colorimétricas, entre amostras de vinho rosé, obtidas pela técnica de CIELab. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).77

Tabela 16: Resultados das análises microbiológicas obtidas para amostras de vinho rosé. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).....78

Tabela 17: Temperaturas de exposição do vinho, desde o processo de pasteurização até ao seu engarrafamento, durante a recolha das amostras de vinho branco.....81

Tabela 18: Diferenças colorimétricas, entre amostras de vinho branco, obtidas pela técnica de CIELab. Amostra D (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra E (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra F (amostra filtrada).82

Tabela 19: Resultados das análises microbiológicas obtidas para amostras de vinho branco. Amostra D (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra E (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra F (amostra filtrada).....83

Índice de Figuras

Figura 1- Variação da produção de vinho de 2014 a 2018, nos principais países produtores (Adaptado de OIV,2019).....	2
Figura 2 - Comparação entre filtração de fluxo perpendicular e filtração tangencial (Adaptado de: Fugelsang e Edwards, 2007).....	18
Figura 3 - Processo de engarrafamento (Adaptado de: Strobl, 2019).....	20
Figura 4 - Complexo de copigmentação (Kennedy, 2010).....	21
Figura 5 - Esquema representativo do mecanismo de condensação antocianina-tanino (Adaptada de (Fulcrand et al., 2006).....	22
Figura 6 - Esquematisação da formação de compostos coloridos em vinhos brancos (Adaptada de Waterhouse et al., 2016).....	24
Figura 7 - Processo de engarrafamento (Adaptado de: Strobl, 2019).....	27
Figura 8 - Esquema do ensaio no qual se variou a velocidade de enchimento da linha de produção.	34
Figura 9 - Esquema do ensaio no qual se retiraram amostras de vinho branco exposto a diferentes metodologias de estabilização microbiológica pré-engarrafamento.	35
Figura 10 - Esquema do ensaio no qual se retiraram amostras de vinho rosé exposto a diferentes metodologias de estabilização microbiológica pré-engarrafamento.	36
Figura 11 - Esquema do ensaio no qual se retiraram amostras de vinho tinto exposto a diferentes metodologias de estabilização microbiológica pré-engarrafamento.....	37
Figura 12 - Quantificação da acidez volátil, das amostras de vinho tinto, envolvidas no estudo comparativo entre diferentes velocidades de enchimento (a) e das amostras envolvidas no estudo comparativo entre técnicas de estabilização microbiológica (b), rosé (c) e de vinho branco (d).....	46
Figura 13 - Quantificação do teor em anidrido sulfuroso total, em partes por milhão (ppm), das amostras de vinho tinto, envolvidas no estudo comparativo entre diferentes velocidades de enchimento (a) e das amostras envolvidas no estudo comparativo entre técnicas de estabilização microbiológica (b), das amostras de vinho rosé (c) e de vinho branco (d)....	47
Figura 14 - Quantificação do teor em anidrido sulfuroso livre, em partes por milhão (ppm), das amostras de vinho tinto, envolvidas no estudo comparativo entre diferentes velocidades de enchimento (a) e das amostras envolvidas no estudo comparativo entre	

técnicas de estabilização microbiológica (b), das amostras de vinho rosé (c) e de vinho branco (d).....48

Figura 15 - Quantificação do índice de fenóis totais ao longo de 5 meses de estágio em garrafa das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).....51

Figura 16 - Quantificação da intensidade de cor, em unidades de absorvância, das amostras de vinho envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).....52

Figura 17 - Quantificação da tonalidade, em unidades de absorvância, das amostras de vinho envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).....53

Figura 18 - Quantificação dos pigmentos poliméricos, em unidades de absorvância, das amostras de vinho envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).....54

Figura 19 - Índice de polimerização das amostras de vinho envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).....54

Figura 20 - Quantificação do teor de antocianinas totais (a), de antocianinas coradas (b) e pigmentos totais (C), em unidades de absorvância, das amostras de vinho envolvidas no

ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).....56

Figura 21 - Quantificação de taninos, em mg/L equivalentes de Epicatequina das amostras de vinho de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).....57

Figura 22 - Pontuações médias da primeira análise sensorial para as amostras de vinho tinto, no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).....61

Figura 23 - Pontuações médias da segunda análise sensorial para as amostras de vinho tinto, no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).....62

Figura 24 - Quantificação do índice de fenóis totais, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).....64

Figura 25 - Quantificação da intensidade de cor, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).....64

Figura 26 - Quantificação da tonalidade, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização

microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).....65

Figura 27 - Quantificação dos pigmentos poliméricos e índice de polimerização das amostras de vinho tinto (a e b, respetivamente) envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).....66

Figura 28 - Quantificação do teor em antocianinas coradas, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).....66

Figura 29 - Quantificação do teor em antocianinas totais, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).....67

Figura 30 - Quantificação do teor em pigmentos totais, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).....68

Figura 31 - Quantificação de taninos, em mg/L equivalentes de Epicatequina das amostras de vinho de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).....69

Figura 32 - Quantificação do índice de fenóis totais, em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra

pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).....72

Figura 33 - Quantificação da intensidade de cor, em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).....73

Figura 34 - Quantificação da tonalidade, em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).....74

Figura 35 - Quantificação dos pigmentos poliméricos e índice de polimerização, em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé (a e b), respetivamente, envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).....75

Figura 36 - Quantificação do teor em antocianinas coradas e totais (a e b, respetivamente), em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).....76

Figura 37 - Quantificação do teor em pigmentos totais, em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo

entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).....76

Figura 38 - Pontuações médias da análise sensorial para as amostras de vinho rosé envolvidas, no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).....80

Figura 39 - Pontuações médias da análise sensorial para as amostras de vinho branco, no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra D (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra E (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra F (amostra filtrada).....85

Enquadramento

O presente trabalho foi realizado sob estágio na Global Wines, no âmbito do mestrado em Biotecnologia da Universidade de Aveiro. O estágio foi realizado nas instalações da Global Wines, que se encontra na região demarcada do Dão em Carregal do Sal, distrito de Viseu. A referida empresa foi fundada em 1990 sob o nome de Dão Sul e atualmente é não só a empresa de vinhos líder no Dão, bem como já se estendeu para as regiões do Alentejo, Bairrada, Douro, Estremadura, dos vinhos verdes e até mesmo para o Brasil.

A empresa engloba todos os estágios da vinificação, desde a vinha até ao engarrafamento. O presente estágio debruçar-se-á principalmente sobre esta última etapa, mais concretamente sobre os processos de estabilização microbiológica anteriores ao enchimento. Complementarmente ao trabalho envolvendo a estabilização microbiológica, também serão analisados aspetos relacionados com a higienização das instalações.

1. Revisão bibliográfica

1.1. Importância económica da indústria vitivinícola

A história do vinho segue em paralelo com a da Humanidade há milhares de anos (Barth, 2007; Ashenfelter *et al.*, 2018) A sua importância cultural, social e económica é inigualável e por tal motivo sempre foi considerada uma bebida de eleição (Anderson e Pinilla, 2018; Campbell e Guibert, 2007; Jenster e Jenster, 1993).

A economia em volta da indústria vitivinícola sofreu grandes alterações no último século devido à globalização do vinho (Pinilla e Kym, 2018). Anteriormente a este fenómeno, a Europa representou um papel pivotal na produção de vinhos, durante vários séculos, podendo ser destacados países como a França, a Itália, a Espanha e Portugal (Campbell e Guibert, 2007; Pinilla e Kym, 2018). Durante a globalização desta indústria, a concorrência destes produtores tradicionais aumentou devido à crescente produção em países como o Chile, a Austrália, a Argentina, os Estados Unidos da América e África do Sul, e ainda pela redução do consumo dentro dos tradicionais países produtores (Bisson *et al.*, 2002; Campbell e Guibert, 2007). Atualmente, embora mais competitiva, esta indústria

ainda é fundamental para o crescimento económico de vários países europeus, contribuindo tanto para a taxa de emprego, bem como para o capital obtido pelos mesmos (Stupino *et al.*, 2019).

Em 2018, a produção global de uvas foi de 77,8 milhões de toneladas, dos quais 57% foram utilizados como matéria prima para a produção de vinho. No total, foram produzidos 292 milhões de hectolitros de vinho. Na Figura 1 encontram-se os 15 principais produtores de vinho em 2018 e as variações das suas produções desde 2014. De acordo com esta tabela, verifica-se que na indústria vitivinícola, Portugal aparece como um grande produtor de vinho, com uma produção de 6,1 milhões de hectolitros em 2018. Portugal é também um dos principais países consumidores de vinho, sendo que desde 2014 o seu consumo vem aumentando gradualmente, estando neste momento nos 5,5 milhões de hectolitros. No que toca a importações e exportações, Portugal também se encontra nos topos. Contudo tem vindo a diminuir as importações e a aumentar as exportações. No ano de 2018 verificou-se que a importação de vinho rondou os 1,9 milhões de hectolitros e a exportação cerca de 3,0 milhões de hectolitros (OIV ,2019).

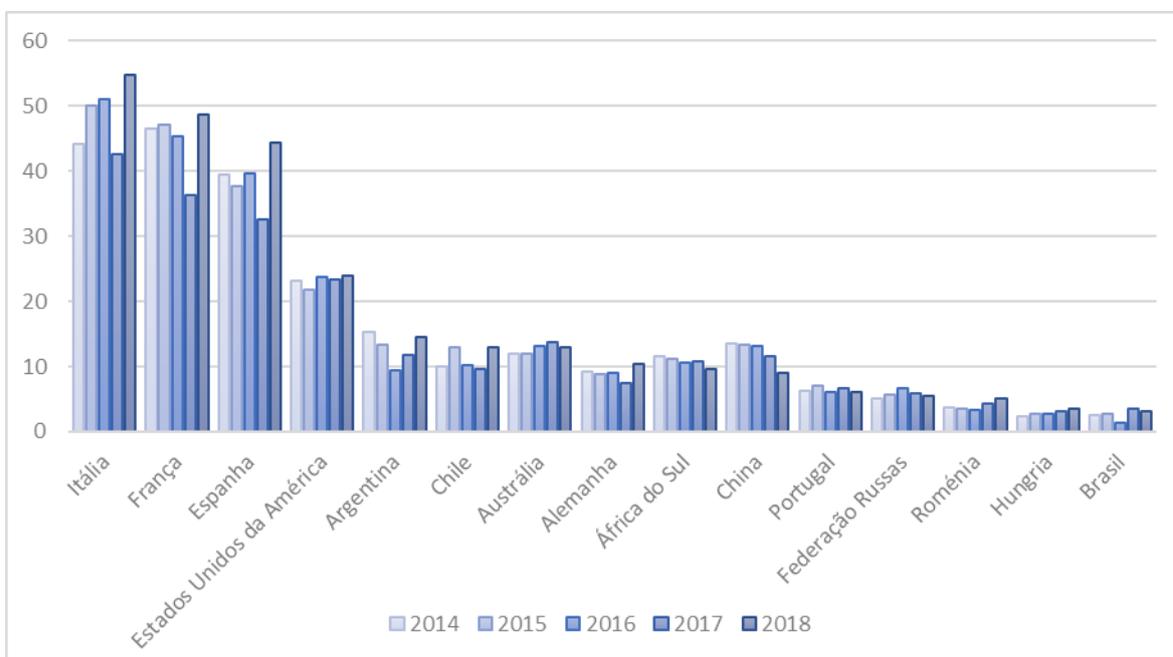


Figura 1. Variação da produção de vinho de 2014 a 2018, nos principais países produtores (Adaptado de OIV,2019)

1.2. Composição do vinho

1.2.1. Composição química

O vinho, de forma muito simplificada, é uma bebida resultante da fermentação alcoólica total ou parcial da uva (Robertson, 2005; OIV, 2020). Contudo, está muito longe de ser assim tão simples. Quimicamente, o vinho é bastante complexo. Embora seja predominantemente composto por água e etanol (representando cerca de 97% do conteúdo total da bebida), este possui mais de 500 compostos (Ali *et al.*, 2010; Waterhouse *et al.*, 2016). Entre os quais se encontram açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, minerais, compostos fenólicos e azotados (Ali *et al.*, 2010; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

A água, sendo o principal constituinte do vinho, desempenha um papel essencial nas características do mesmo. Este componente é crucial para várias reações químicas que decorrem ao longo da vinificação, desde o cultivo da vinha até ao envelhecimento do vinho. Além disso, apenas compostos que sejam solúveis ou parcialmente solúveis em água têm um papel significativo no vinho (Ronald S. Jackson, 2014). A água tem a capacidade de formar ligações intermoleculares de hidrogénio, e consequentemente influencia a solubilidade dos outros compostos e a tensão superficial da água. Certos compostos essenciais para as características organoléticas do vinho são hidrofóbicos e, por essa razão tendem a ser pouco solúveis em água. É a miscibilidade da água com o etanol que atenua estas características, permitindo a solubilidade de compostos apolares. (Waterhouse *et al.*, 2016).

De todos os álcoois presentes no vinho, o etanol representa a maior fatia em termos percentuais (Aquarone *et al.*, 2001; Ronald S. Jackson, 2014). Como visto anteriormente, o etanol age como um co-solvente. Contudo, este álcool é também essencial para o envelhecimento, estabilidade e propriedades organoléticas do vinho (Ronald S. Jackson, 2014). A origem deste composto no vinho está associada à fermentação alcoólica (Aquarone *et al.*, 2001; Mander and Liu, 2010; Ronald S. Jackson, 2014). O teor em álcool no final da fermentação alcoólica está dependente da quantidade de açúcares fermentáveis presentes no mosto, da temperatura a que ocorre a fermentação e do tipo de levedura. Álcoois compostos por mais de dois átomos de carbono, denominados de álcoois

superiores, também são constituintes do vinho e geralmente representam cerca de 50% dos constituintes responsáveis pelo aroma do vinho. Entre estes álcoois encontram-se o 2-metil-1-propanol, o 2-metil-1-butanol, o 3-metil-1-butanol, o 3-metilsufanil-1-propanol e o 2-feniletanol. Estes álcoois, bem como o etanol, são originados principalmente durante a fermentação alcoólica e a sua concentração depende da presença de oxigénio e de partículas em suspensão no mosto, bem como da temperatura durante a fermentação (Jackson, 2014; Waterhouse *et al.*, 2016).

Os açúcares são de extrema importância para o vinho. Estes são originários das uvas, constituindo cerca de 20% do seu conteúdo, estando diretamente dependentes da casta, da maturação do fruto e do clima. Os açúcares presentes em maior percentagem, nas uvas, são a glucose e a frutose. (Aquarone *et al.*, 2001; Ronald S. Jackson, 2014). Estes dois açúcares encontram-se geralmente em concentrações muito semelhantes, contudo em estágios de maturação mais avançados há uma maior concentração de frutose. O conteúdo em açúcar é importante durante a fermentação, mais concretamente para o metabolismo e crescimento das leveduras. Para além da sua importância na fermentação, os açúcares, mais concretamente os açúcares não fermentados, concedem a doçura aos vinhos. O sabor do vinho é ainda influenciado pela metabolização dos açúcares em esteres, aldeídos e álcoois superiores (Ronald S. Jackson, 2014).

Os ácidos orgânicos presentes no vinho podem ser derivados do fruto, do metabolismo da microbiota existente durante a vinificação ou podem ainda ter uma origem exógena (Butnariu e Butu, 2019; Waterhouse *et al.*, 2016). A sua principal função no vinho é a regulação do pH do mesmo, isto porque este é um fator que afeta o sabor do vinho, em concreto a sua acidez, e a estabilidade, tanto química como microbiológica. Os principais ácidos orgânicos encontrados no vinho são o ácido tartárico, málico, cítrico, láctico, succínico e acético (Mander and Liu, 2010; Ronald S. Jackson, 2014; Waterhouse *et al.*, 2016).

O ácido tartárico é o ácido com maior percentagem no vinho. Este ácido influencia bastante o pH do vinho, pelo que é considerado o principal ácido utilizado para aumentar o pH dos vinhos (Aquarone *et al.*, 2001; Ronald S. Jackson, 2014). Contudo, caso esteja presente em concentrações muito elevadas pode provocar a precipitação de hidrogenotartarato de potássio (IVDP, 2008). O seu uso como regulador de acidez está legislado podendo apenas serem aplicados 4 g/L (The International Organisation of Vine

and Wine, 2020). O ácido málico representa perto de 50% da acidez total do mosto e do vinho. A sua concentração é indicadora do estágio de maturação da uva, uma vez que vai diminuindo à medida que a uva vai amadurecendo. Este ácido pode originar etanol através da sua fermentação por leveduras, ou então pode ser metabolizado por bactérias lácticas, dando origem a ácido láctico e CO₂ (Butnariu e Butu, 2019). O ácido cítrico é utilizado para tratar a turvação do vinho provocada pelo elevado teor de ferro. Este ácido é degradado por bactérias maloláticas, originando produtos que incrementam a acidez volátil (Aquarone *et al.*, 2001).

Em concentrações menores encontram-se os ácidos láctico, succínico e acético. Todos são subprodutos da fermentação alcoólica. Destes, o ácido acético é de extrema importância pois pode ser indicador de deterioração por bactérias lácticas ou acéticas (Waterhouse *et al.*, 2016).

Os minerais presentes no vinho podem ter diversas origens, porém a maioria provém da própria uva. O próprio material utilizado para a vinificação pode ser a fonte destes materiais, contudo a crescente utilização de materiais de aço inoxidável e de plástico alimentar promoveram a redução desta transmissão. A maior parte dos minerais resultam de sais de potássio metálico, contudo sais de sódio, ferro, cobre, alumínio, magnésio e cálcio também contribuem para a concentração de minerais dissolvidos no vinho (Andrew L Waterhouse *et al.*, 2016). A principal ação dos minerais ocorre sobre a qualidade do vinho, sendo esta ação dependente dos minerais em questão (Butnariu e Butu, 2019).

Os compostos fenólicos englobam todos os compostos que possuem grupos hidroxilo ligados a anéis aromáticos (Waterhouse *et al.*, 2016). Estes são de extrema importância para o vinho, nomeadamente para a sua qualidade e características organolépticas (Aquarone *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2007; Ronald S. Jackson, 2014). Estes possuem atividade antimicrobiana, antioxidante e coagulante de proteínas (Aquarone *et al.*, 2001; Butnariu e Butu, 2019). Podem ser originários do fruto ou da fermentação por leveduras, contudo, deste último em quantidades vestigiais (Ronald S. Jackson, 2014). Os compostos fenólicos subdividem-se em flavonoides e não-flavonoides. Os flavonoides são aqueles que mais estão envolvidos na qualidade do vinho, e dentro destes encontramos os flavonóis, antocianinas e flavanóis. (Waterhouse *et al.*, 2016). As antocianinas são corantes vermelhos, podem ser encontradas quer nas uvas, quer nos vinhos e a sua concentração em

vinhos novos depende da variedade, do estágio de maturidade da uva e do método vitivinícola selecionado (Aquarone *et al.*, 2001; Butnariu e Butu, 2019).

Os compostos azotados são na sua maioria aminoácidos, polipéptidos e proteínas. Embora pouco influenciem o sabor do vinho, são bastante importantes como nutrientes para as bactérias e leveduras (Aquarone *et al.*, 2001). As proteínas têm ainda outro impacto no vinho, embora não estejam presentes em quantidades suficientes para afetar o sabor, as proteínas desnaturam com calor, acabando por provocar turvação dos vinhos. Consequentemente esta turvação afeta a qualidade do vinho e por este motivo é necessário o controlo dessas proteínas (Andrew Leo. Waterhouse *et al.*, 2016).

1.2.2. Composição microbiológica

O vinho é um meio bastante seletivo no que toca a microrganismos. O pH baixo, o etanol e a depleção dos nutrientes ao longo da sua produção, reduzem significativamente o número de bactérias e leveduras capazes de proliferar (E. Bartowsky, 2017; Fugelsang, 1997b). Contudo, a produção de vinho é bastante dependente deste microrganismos, uma vez que depende de uma série de reações bioquímicas levadas a cabo por estes (Bartowsky, 2017; Moreno-Arribas e Polo, 2005). A microbiota do vinho é principalmente composta por leveduras e bactérias e as suas funções prendem-se essencialmente na conversão dos açúcares da uva em álcool e na produção de características organolépticas desejadas (Bartowsky, 2009).

De todos os microrganismos existentes no vinho, os mais importantes na produção do vinho são as leveduras (Fugelsang e Edwards, 2007; Santiago *et al.*, 2011). Estes microrganismos levam a cabo a fermentação alcoólica, permitindo a conversão de açúcares em etanol (Bartowsky, 2017). Para além disto, o seu metabolismo tem ainda um grande impacto quer no sabor, quer no aroma do produto final (Romano *et al.*, 2003). As leveduras utilizadas na produção de vinho surgem essencialmente a partir de quatro origens: podem já estar presentes no fruto: podem estar presentes na adega e posteriormente contaminar o mosto e o vinho; podem surgir a partir de insetos vetores como drosófilas e abelhas; ou, podem ser diretamente inoculadas através do uso de leveduras secas ativas (Bisson e Joseph, 2009).

As bactérias lácticas e acéticas são os dois grupos de bactérias com maior importância significativa na vinificação. As bactérias lácticas, são responsáveis pela fermentação

malolática. Estas bactérias podem metabolizar ácido L-málico e açúcar, por fermentação homolática ou heterolática, sendo que no primeiro tipo de fermentação o único produto obtido é o ácido láctico, enquanto que na segunda fermentação obtém-se ácido láctico, etanol/acetato e CO₂ (Bisson e Joseph, 2009; Fugelsang e Edwards, 2007). A fermentação malolática, conduzida por estas bactérias, oferece estabilidade microbiológica e reduz a acidez do vinho (Bartowsky, 2017). Quanto às bactérias acéticas, estas são vistas como prejudiciais para a produção de vinho, uma vez que oxidam o etanol para formar ácido acético (Fugelsang e Edwards, 2007).

1.2.3. Microrganismos de deterioração

Uma das principais preocupações, ao longo de todo o processo de vinificação, é a deterioração do vinho com base microbiológica, já que coloca em causa a qualidade do produto final (Ubeda e Briones, 1999). A deterioração pode ser causada quer por leveduras, quer por bactérias (Ubeda e Briones, 1999). Já no que respeita às fontes destas deteriorações, estas podem dever-se a insetos, à película da uva e a todo o material que esteja em contacto direto com o vinho nos seus vários estágios de produção (van Wyk e Silva, 2019).

O conceito de microrganismos de deterioração não engloba só os microrganismos que apenas têm um efeito negativo, mas todos aqueles que têm o potencial de o fazer, sob determinadas condições (Boulton *et al.*, 1999). Leveduras e bactérias com importância para as fermentações podem ser prejudiciais para o vinho (van Wyk e Silva, 2019). A própria deterioração de vinhos não se prende apenas à presença de determinado composto, uma vez que depende da concentração do mesmo e do tipo de vinho (Bartowsky, 2009; Boulton *et al.*, 1999). Na tabela 2 são visíveis algumas leveduras com potencial prejudicial para o vinho.

Tabela 1. Leveduras envolvidas na deterioração do vinho (adaptado de: Campaniello e Sinigaglia, 2017)

Leveduras	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pode provocar re-fermentação de açúcares residuais.
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	O seu crescimento no vinho engarrafado gera sedimentos no fundo da garrafa
<i>Brettanomyces bruxellensis/ Dekkera bruxellensis</i>	A <i>Brettanomyces bruxellensis</i> gera compostos voláteis provocadores de um aroma não desejável.
<i>Zygosaccharomyces</i> (<i>Z. bailii</i> , <i>Z. bisporus</i> , <i>Z. rouxii</i> e <i>Z. florentinus</i>)	São espécies osmofílicas, produzem turvação e sedimentos no vinho. São resistentes aos conservantes e à elevada concentração de etanol.
<i>Candida sp.</i> , <i>Debaryomyce sp.</i> , <i>Hanseniaspora sp.</i> , <i>Hansenula sp.</i> , <i>Kloeckera sp.</i> , <i>Pichia sp.</i> , <i>Metschnikowia sp.</i> , <i>Saccharomycodes sp.</i> , <i>Torulaspora sp.</i>	Estas leveduras oxidam etanol e produzem ésteres, acetaldeído e compostos voláteis <i>Hansenula anomala</i> cresce como se fosse uma camada de biofilme e produz altos teores de acetato de etilo e acetato de isopentilo. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> cresce como se fosse uma camada de biofilme e produz altos teores de acetato de etilo e acetaldeído. <i>Saccharomycodes ludwigii</i> produz elevadas concentrações de acetaldeído. É extremamente tolerante ao etanol e resistente a SO ₂ e sorbato de potássio.

As bactérias lácticas, bem como as leveduras, embora possam ter efeitos benéficos no vinho, também se podem apresentar prejudiciais para o mesmo. Estes microrganismos podem atenuar a cor, formar aminas biogénicas e produzir aromas desagradáveis. Na tabela 2 é possível ver as principais bactérias lácticas prejudiciais ao vinho e o seu efeito no mesmo.

Tabela 2 - Defeitos provocados por bactérias lácticas (adaptado de: Delanoe *et al.*, 2005)

Agente responsável	Características do vinho	Substâncias produzidas
Género <i>Lactobacillus</i>	Aroma azedo/depósito	Ácido láctico/ ácido acético/ CO ₂
Género <i>Lactobacillus</i>	Gosto amargo/ matéria corante alterada	Ácido pirúvico / ácido acético
<i>Pediococcus damnosus</i>	Consistência oleosa/ desequilíbrio no paladar	Envelope mucilaginoso de dextrases
Género <i>Lactobacillus</i>	Sabor ácido e adocicado	Manitol/ ácido acético/ ácido pirúvico/ ácido láctico

As bactérias acéticas, como dito anteriormente, estão associadas à deterioração do vinho. Estas bactérias são bastante ubíquas e produzem ácido acético a partir de glicose. Os três gêneros mais encontrados nas uvas e no vinho são *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* e *Acetobacter*. As espécies pertencentes ao gênero *Acetobacter* são geralmente isoladas no vinho, por possuírem uma melhor tolerância ao etanol, já as espécies pertencentes ao *Gluconacetobacter* são isoladas no mosto, devido à sua preferência por meios açucarados. Estas bactérias são prejudiciais para o vinho essencialmente por três dos seus metabolitos, o ácido acético, o acetato de etilo e o acetaldeído. O ácido acético confere um aroma avinagrado e sabor ácido ao vinho, o acetaldeído reduz as propriedades antimicrobianas do SO₂ e dependendo da sua concentração poderá ter um efeito positivo ou negativo no aroma do vinho, e o acetato de etilo confere-lhe um aroma intenso, semelhante a verniz para as unhas (Campaniello e Sinigaglia, 2017).

1.3. Estabilização microbiológica de vinhos engarrafados

No mercado atual, o consumidor procura produtos alimentares que sejam o mais naturais possível, isto é, com um baixo grau de processamento, e esperam que esses mesmos produtos sejam microbiologicamente seguros (Santos *et al.*, 2012). A presença de microrganismos de alteração pode afetar a qualidade do produto final (Cosme *et al.*, 2017; Matias *et al.*, 2016). O ponto crítico, no qual a presença destes microrganismos é principalmente indesejada, é no vinho engarrafado (García-Ríos *et al.*, 2018). De modo a controlar estes microrganismos, a indústria vitivinícola recorre tanto a tratamentos físicos como químicos (Campaniello e Sinigaglia, 2017; Costa *et al.*, 2008; Fugelsang, 1997; García-Ríos *et al.*, 2018).

1.3.1. Tratamentos químicos

1.3.1.1. Tratamento com dióxido de enxofre

O dióxido de enxofre, vulgarmente conhecido por sulfuroso, é um aditivo amplamente conhecido na indústria alimentar (Fugelsang, 1997b). Na indústria vitivinícola é o principal aditivo utilizado para controlar o crescimento microbiano, devido à sua atividade antioxidante e antimicrobiana (Cosme *et al.*, 2017; Escott *et al.*, 2017; Fugelsang,

1997; Santos *et al.*, 2012). Para além destas propriedades, o dióxido de enxofre melhora as propriedades organoléticas do vinho, na medida em que se associa com o ácido pirúvico e o acetaldeído (substâncias com aroma e sabor intenso) (Giacosa *et al.*, 2019), auxilia a extração de compostos fenólicos da película da uva (van Wyk e Silva, 2019) e ainda tem uma pequena ação de clarificação. Este composto pode ser aplicado sob diferentes formas. A forma mais antiga e ainda muito utilizada para desinfetar as barricas, é através da sua combustão. Atualmente, a forma de aplicação mais usada é na forma líquida. Esta forma permite maior segurança, dispersão e gestão do que na forma gasosa. Para além destas, o dióxido de enxofre pode ainda ser aplicado em forma de sais (Giacosa *et al.*, 2019). O dióxido de enxofre existe na forma livre e na forma combinada. A forma livre está presente no vinho sob as formas: sulfito (SO_3^{2-}) bissulfito (HSO_3^-) e molecular (H_2SO_3). Esta última é a mais ativa, pelo que é capaz de penetrar as células por difusão simples ou transporte ativo e, uma vez dentro da célula, liga-se aos mais diversos constituintes afetando diversos sistemas enzimáticos. O balanço entre a fração livre e a fração combinada é dependente do pH e das moléculas que se ligam ao SO_2 (Guerrero & Cantos-Villar, 2015). A fração combinada está associada a alguns compostos presentes no vinho, como por exemplo acetaldeídos, ácidos cetónicos e açúcares (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Na forma HSO_3^- o dióxido de enxofre comporta-se como um nucleófilo, que tem a habilidade de se ligar com a forma catiónica flavilium das antocianinas, provocando uma descoloração deste pigmento (Waterhouse *et al.*, 2016).

Apesar do dióxido de enxofre apresentar bastantes vantagens, o seu uso tem sido cada vez menor. O principal motivo para a diminuição da sua utilização está relacionado com os efeitos adversos no ser humano, uma vez que este composto pode provocar reações alérgicas, asma, dor abdominal, dores de cabeça e bronco-constricção. Atualmente devido a este risco, a união Europeia permite que os vinhos tintos secos (vinhos tintos com uma percentagem de açúcares inferior a 4g/L) tenham no máximo 150 mg/L e os vinhos brancos 200mg/L (van Wyk e Silva, 2019). A utilização excessiva deste composto pode ainda afetar as características organoléticas do vinho, reduzindo a qualidade do mesmo (Guerrero e Cantos-Villar, 2015).

1.3.1.2. Tratamento com ácido ascórbico

A vitamina C é um constituinte da uva, porém apresenta-se em pequenas quantidades. Este ácido endógeno da uva, vai-se degradando nos primeiros arejamentos durante a fermentação. O ácido ascórbico exógeno tem sempre que ser aplicado em conjunto com SO₂. A sua oxidação gera ácido desidroascórbico ou peróxido de hidrogénio. Este último é gerado na presença de grandes quantidade de oxigénio, daí a importância de usar em conjunto com dióxido de enxofre, uma vez que, o peróxido de hidrogénio pode oxidar determinados componentes do vinho, provocando a deterioração do mesmo (Célia *et al.*, 2012; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). A reação de oxigenação do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico gera dois eletrões, que conferem a atividade redutora do ácido ascórbico. Esta particularidade permite a proteção do vinho contra a precipitação de ferro (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). O ácido ascórbico também desempenha um papel antioxidante (Barril *et al.*, 2016). Este consome oxigénio através de uma reação catalisada por ferro ou cobre, contudo o seu efeito apenas é substancial se a quantidade de oxigénio for pouca. O efeito antioxidante do ácido ascórbico combina com o do SO₂. O do SO₂ é estável, contudo não tem um efeito imediato e o do ácido ascórbico é quase instantâneo, contudo não aguenta com um arejamento constante (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). O uso de ácido ascórbico nos vinhos tem ainda uma última vantagem, uma vez que este composto confere um aroma mais fresco, menos oxidado e menos maduro (Morozova *et al.*, 2015).

1.3.1.3. Tratamento com ácido sórbico

O ácido sórbico é um ácido fraco, cuja baixa toxicidade permite que seja usado como conservante do vinho. Outra das vantagens, é que o pH normal do vinho (entre 3 e 4) é ideal para a atividade deste ácido (Steiner *et al.*, 2010). O seu efeito antimicrobiano é contrário ao SO₂, isto é, a sua atividade como antifúngico é superior à sua atividade antibacteriana, sendo que esta última é pouco significativa. Por este mesmo motivo, o uso do ácido sórbico deve ser para complementar o dióxido de enxofre e não substituí-lo (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Outras das desvantagens é o facto da sua eficiência ser comprometida caso a concentração de leveduras ou bactérias seja elevada. Estes microrganismos têm a capacidade de metabolizar este composto, aliás algumas bactérias maloláticas ao metabolizarem este ácido dão origem a compostos como o 2-etoxihexa-3,5-

dieno que provocam um mau aroma, semelhante a gerânio (Crowell e Guymon, 1975; Steiner *et al.*, 2010).

1.3.1.4. Tratamento com dimetildicarbonato (DMDC)

O DMDC é uma outra alternativa química para a estabilização microbiológica que, não acrescenta aroma ou sabor característico do vinho (Nieto-Rojo *et al.*, 2015). Este composto é geralmente utilizado aquando do engarrafamento e é essencialmente utilizado para controlar leveduras, uma vez que, não afeta significativamente as bactérias lácticas e acéticas (Costa *et al.*, 2008). O processo de inibição inicia-se com a degradação do DMDC em metanol e dióxido de carbono. Em seguida, dá-se a penetração da parede celular do microrganismo e a degradação das enzimas, nomeadamente a álcool desidrogenase e o gliceraldeído-3 fosfato (Nieto-Rojo *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2012). A sua eficácia está dependente da temperatura, do pH, do teor de etanol do meio e do número de células e estirpes de microrganismos existentes (Costa *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012). A sua utilização, contudo, é ainda dependente do uso de SO₂, pois não é capaz de proteger o vinho contra oxidações. Para além disto, é ainda necessário ter em atenção a conversão de DMDC em metanol, uma vez que este é tóxico (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

1.3.1.5. Tratamento com lisozima

A lisozima é uma enzima ubíqua na natureza, estando presente em animais, plantas, bacteriófagos e bactérias. Comercialmente, esta enzima é isolada a partir da clara do ovo. Esta enzima atua através da hidrolisação da parede celular e é especialmente eficaz em bactérias de gram-positivo. Mais concretamente, esta enzima quebra as ligações β-1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina, componentes dos peptidoglicanos, que, por sua vez, estão presentes na parede celular. Embora os peptidoglicanos estejam presentes tanto na parede celular das bactérias gram-positivas como das gram-negativas, a sua eficácia é superior nas primeiras. Isto deve-se à quantidade, ao *cross-linking* e à espessura dos peptidoglicanos ser superior nas bactérias gram-positivo (Liburdi *et al.*, 2014).

O uso desta enzima nos vinhos prende-se muito ao controlo das bactérias lácticas.

Durante a vinificação, a lisozima pode ser utilizada na ocorrência de fermentações alcoólicas comprometidas, para impedir a fermentação malolática nos vinhos brancos, atrasar o desenvolvimento das bactérias lácticas nos vinhos tintos durante a fermentação malolática e para a estabilização microbiológica após a fermentação malolática (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Contudo, embora a utilização de lisozima permita reduzir a quantidade de SO₂ utilizada, esta não substitui por completo o seu uso. Esta enzima não tem as propriedades antimicrobianas não específicas, não possui propriedades antioxidantes, nem protege ou melhora o sabor do vinho como o SO₂. Além disso, a sua utilização é posta em causa devido à sua atividade alergénica (Liburdi *et al.*, 2014).

1.3.2. Tratamentos físicos

1.3.2.1. Pasteurização

A pasteurização é um método de estabilização microbiológica frequentemente utilizada na indústria das bebidas. O método consiste num tratamento de calor, que inibe ou elimina vários microrganismos (Malletroit *et al.*, 1991). No vinho, a maioria dos microrganismos existentes são termossensíveis. Deste modo, temperaturas amenas serão suficientes para garantir a estabilidade microbiológica. Contudo, a maioria dos produtores sente-se relutante ao usar este método devido à suposta alteração das qualidades organoléticas do vinho (Malfeito-Ferreira, 2014).

Existem diferentes técnicas de pasteurização. O processo de pasteurização comum, baseia-se no aquecimento do vinho num permutador de calor, onde o vinho passa em contracorrente com água a 60 ou 65 °C. Um método menos prejudicial para as características organoléticas do vinho é a pasteurização *flash*. Neste método o vinho é aquecido durante alguns segundos num permutador, onde a água passa a 90 °C. Como complemento a estas técnicas, o vinho pode ainda ser engarrafado a quente. Nesta técnica o vinho é aquecido até à temperatura mínima para eliminar leveduras (45-50 °C) e é depois engarrafado, esterilizando tanto a garrafa como a rolha no momento do engarrafamento por contacto com o vinho quente (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

O aquecimento prolongado do vinho pode afetar as qualidades organoléticas deste, de forma similar ao envelhecimento natural. Há uma formação de compostos que geram aromas, na presença de ar, que confere um sabor ‘amadeirado’. O calor permite ainda

desnaturar enzimas, mais concretamente oxidases, inibindo assim as reações catalisadas por estas enzimas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Em termos económicos, esta técnica é madura o suficiente para que o seu design e custos em geral fossem aperfeiçoados e diminuídos. Em comparação com os campos elétricos pulsados e o processamento de alta pressão, esta técnica é mais económica (Sampedro *et al.*, 2014).

1.3.2.2. Campos elétricos pulsados (PEF), descargas elétricas de alta voltagem (HVED)

Estes dois métodos físicos utilizam a corrente elétrica como meio de estabilização microbiológica. O PEF é uma técnica rápida, de baixo consumo energético e alta eficiência, que permite inativar microrganismos à temperatura ambiente, afetando minimamente a qualidade do alimento. Esta técnica baseia-se na aplicação de campos elétricos de elevada intensidade sob a forma de pulsos de curta duração, entre dois eletrodos (Cosme *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2012; van Wyk e Silva, 2019; van Wyk *et al.*, 2019). O HVED também se baseia no mesmo conceito, contudo forma arcos elétricos entre eletrodos planos ou pontiagudos e a intensidade do campo elétrico é superior, permitindo até a fragmentação de partículas sólidas (Delsart *et al.*, 2016). Ambos os métodos assentam no princípio que, aquando da aplicação de um campo elétrico externo origina-se uma diferença de potencial ao longo da membrana celular. Esta diferença de potencial por sua vez leva à permeabilização da membrana celular e à abertura de poros ao longo da mesma, permitindo a perda de fluídos intracelulares (Cosme *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2012; van Wyk *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2016).

A intensidade do campo elétrico necessária para inativar os microrganismos depende do tamanho e da forma da célula. Células maiores são mais afetadas pelo campo elétrico, o que significa que, no vinho, as leveduras são mais suscetíveis a este método do que as bactérias. Células com forma esférica requerem menor intensidade elétrica do que células em forma de bastonete, isto pode ser explicado pelo facto destas últimas se colocarem em direção paralela ao campo elétrico (Delsart *et al.*, 2016; van Wyk e Silva, 2019). A eficiência destes métodos é ainda afetada pela temperatura e pela quantidade de etanol existente no meio. O campo elétrico é mais eficaz em meios com temperaturas mais altas e com teor de álcool mais elevado (Yang *et al.*, 2016).

Segundo Abca e Akdemir Evrendilek (2014), a submissão de vinho tinto a pulsos de 31 kV/cm a cada 3 μ s a uma temperatura de 40 °C não gera qualquer efeito no conteúdo fenólico, na cor e na atividade antioxidante do mesmo. Já a aplicação de 100 pulsos com a mesma intensidade elétrica afeta um pouco a concentração de taninos, o índice de compostos fenólicos e a intensidade de cor. Delsart *et al* (2016), após o tratamento de vinhos tintos com HVDE e PEF, observaram um aumento dos açúcares, efeito este com menor intensidade no último. Estes autores também observaram uma diminuição da concentração de antocianinas após a aplicação de HVED.

O grande problema associado a estes métodos é a libertação de metais dos elétrodos utilizados. Como o eletrodo entra em contacto direto com os alimentos, a sua corrosão pode levar a um aumento desses mesmos metais no alimento (van Wyk *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2016). Segundo Evrendilek e colaboradores (2004), após o tratamento de cerveja com PEF, houve um aumento significativo da concentração de ferro, cromo, zinco e manganês.

O custo da tecnologia PEF depende essencialmente do custo capital e do consumo de energia. Num estudo de análise de custos entre as tecnologias HPP, PEF e tratamento térmico observou-se que esta tecnologia é mais rentável que a HPP contudo mais cara do que a pasteurização (Sampedro *et al.*, 2014).

1.3.2.3. Radiação ultravioleta

A gama de radiação ultravioleta utilizada para estabilização microbiológica pode ser entre os comprimentos de onda 320-400 nm (UV-A), entre os 280-320 nm (UV-B) e entre 200-280 nm (UV-C). Na indústria alimentar a radiação que mais é empregue é a UV-C uma vez que esta não afeta os parâmetros de qualidade do vinho (van Wyk e Silva, 2019)

A base deste método assenta no rearranjo dos ácidos nucleicos da microbiota, inibindo a reprodução e outras funções celulares dos mesmos. A eficácia da técnica está dependente da absorvância, da densidade, da cor, dos sólidos dissolvidos e suspensos do alimento (Fredericks *et al.*, 2011; van Wyk e Silva, 2019). Para além disso, a eficácia é ainda dependente do microrganismo em questão, da espécie, da estirpe e do estágio de crescimento (Fredericks *et al.*, 2011).

1.3.2.4. Ultrassons

O uso da sonificação é outra das técnicas usadas para a estabilização microbiológica. Esta tem ainda a capacidade de acelerar o processo de envelhecimento (Lukić *et al.*, 2019). O espectro do ultrassom utilizado pode ser dividido em três categorias: ultrassom de diagnóstico, que varia entre 1 e 10 MHz, ultrassom de alta frequência, que varia entre 100 KHz e 1 MHz e ultrassom de baixa frequência, variando de 20 a 100 KHz. Esta última categoria é capaz de gerar pequenas bolhas que ao rebentarem originam um efeito de cavitação, radicais livres (Gracin *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2012; van Wyk e Silva, 2019), ondas de choque, tensões de corte, e zonas de elevada temperatura e pressão (van Wyk e Silva, 2019). Os microrganismos são inativados devido ao colapso da membrana celular provocado pelas tensões de corte e pelos radicais livres, que atacam e podem conduzir à lise celular.

A eficácia deste método é dependente do tamanho, da forma das células e da espécie de microrganismo (Gracin *et al.*, 2016). O uso de ultrassons demonstra-se promissor, como agente antimicrobiano, contudo esta técnica pode também ser usada para acelerar o processo de envelhecimento, uma vez que proporciona alterações no vinho semelhantes às do envelhecimento natural (van Wyk e Silva, 2019). Esta técnica, em estudos anteriores, demonstrou afetar o sabor, o aroma (Luo *et al.*, 2012) e a cor (Zhang e Wang, 2017).

1.3.2.5. Processamento de alta pressão (HPP) e homogeneização de alta pressão (HPH)

O processamento de alta pressão é um método que permite inativar microrganismos em alimentos, a partir da aplicação de altas pressões (100 a 600 MPa) (van Wyk e Silva, 2019) de forma instantânea e uniforme (Santos *et al.*, 2012), afetando pouco as qualidades sensoriais do vinho (Santos *et al.*, 2015). A inibição microbiológica é conseguida através da disrupção da membrana celular e da desnaturação proteica, levando à perda de fluídos intracelulares (Santos *et al.*, 2012; van Wyk e Silva, 2019). Este efeito inibitório é influenciado pela temperatura, pressão, tempo de atuação e tamanho das células (van Wyk e Silva, 2019).

O efeito desta técnica sobre a qualidade do vinho já foi estudada por Santos *et al* (2015) e Buzrul (2012). Buzrul (2012) observou que pressões entre os 200 e os 500 MPa

de 1 a 20 minutos não provocavam alterações significativas nas qualidades sensoriais. Já pressões superiores (650 MPa), durante períodos superiores de tempo (1 a 2 horas), alteravam o teor em compostos fenólicos e a intensidade da cor. Mok e colaboradores (2006), observaram que a 350 MPa durante 10 minutos, o tratamento de vinho tinto com HPP não provocava efeitos quer no sabor, quer no aroma do mesmo. Os grandes entraves a esta tecnologia são o facto de apenas operar em *batch* e o facto do investimento inicial ser muito elevado (van Wyk e Silva, 2017).

A homogeneização a altas pressões varia da HPP pois funciona como um sistema contínuo que, não depende apenas da pressão para inativar os microrganismos. Outros mecanismos físicos como tensão de corte, turbulência e fenómenos de cavitação participam no processo de inativação. Todos estes fenómenos conduzem à permeabilização das células e disrupção da estrutura celular. (Comuzzo e Calligaris, 2019).

O custo do HPP depende essencialmente do custo capital, da mão de obra e da energia. Segundo (Sampedro et al., 2014) esta tecnologia, no geral é mais dispendiosa do que a pasteurização e o PEF.

1.3.2.6. Filtração

A filtração é um processo físico, no qual há uma retenção de partículas, em suspensão numa solução líquida, após a passagem através de uma barreira (filtro). Os filtros possuem poros e dependendo do seu tamanho, tanto podem remover partículas com diâmetros superiores a 100 μm , como moléculas e iões com diâmetros inferiores a 10^{-3} μm . Assim, é compreensível que a filtração possa ter diferentes propósitos dependendo do tamanho dos poros do filtro (Jackson, 2014). Uma dessas funções é a redução do número de microrganismos presentes no vinho (Duarte *et al.*, 2017; Fugelsang e Edwards, 2007). Os filtros utilizados para este trabalho são classificados como filtros de microfiltração, isto é, possuem poros que variam entre 0,1 e 1 μm de diâmetro (Fugelsang e Edwards, 2007; Jackson, 2014). O tamanho *standart* para a estabilização microbiológica é de 0,45 μm , tamanhos inferiores podem dificultar o fluxo de determinados vinhos, o que o torna demasiado lento para ser viável. Já tamanhos superiores não garantem a retenção de bactérias (Fugelsang e Edwards, 2007).

Os processos de filtração em si podem ser classificados em filtração de fluxo perpendicular e filtração de *cross-flow*. O método clássico envolve o primeiro tipo de

filtração e pode ainda ser subdividido em filtração de profundidade e filtração estéril. A filtração estéril é o método de filtração perpendicular utilizado para a remoção de microrganismos, uma vez que a filtração de profundidade não é capaz de os remover. A filtração *cross-flow* difere da perpendicular na medida em que a primeira tem um fluxo tangencial à membrana, o que permite a remoção das partículas retidas na mesma. Já na filtração perpendicular há uma maior probabilidade de os poros ficarem obstruídos, pois as partículas que não atravessam a membrana ficam retidas nesta. Na Figura 2 é possível observar os dois tipos de filtração. Embora a filtração microbiológica possa ser feita por filtração *cross-flow*, esta deve ser evitada, uma vez que, não existe nenhum teste semelhante ao teste de integridade feito na filtração perpendicular estéril. Teste este, que permite averiguar a integridade das membranas e a eficácia da filtração (Fugelsang e Edwards, 2007).

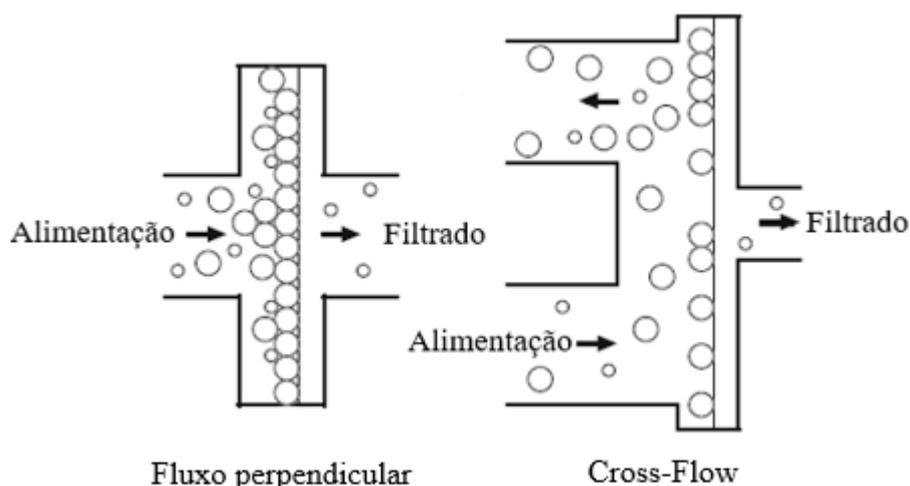


Figura 2 - Comparação entre filtração de fluxo perpendicular e filtração tangencial (Adaptado de: Fugelsang e Edwards, 2007)

Uma das grandes preocupações da utilização desta técnica prende-se na possibilidade desta afetar as características sensoriais do vinho (Duarte *et al.*, 2017; McRae *et al.*, 2017; Canas *et al.*, 2011). Principalmente na filtração dos vinhos tintos há uma grande possibilidade de ocorrer colmatagem do filtro, que por sua vez pode levar a uma redução do conteúdo em macromoléculas no vinho filtrado. A colmatagem deve-se a interações entre macromoléculas do vinho, nomeadamente polissacarídeos e compostos fenólicos, e a superfície da membrana (McRae *et al.*, 2017). Para além do teor em macromoléculas, a filtração também já foi associada a alterações da cor e do teor de outros compostos

associados às características organoléticas do vinho. Contudo, essas alterações não provocam necessariamente alterações nas propriedades sensoriais do vinho (Buffon *et al.*, 2014). Já Canas *et al.*, (2011), McRae *et al.*, (2017) não observaram alterações significativas nas propriedades organoléticas do vinho após a filtração.

1.4. Mecanismos de envelhecimento em garrafa

O vinho, distintivamente de outros produtos alimentares, pode sofrer alterações sensorialmente agradáveis no decurso do seu envelhecimento (Ugliano, 2013). O envelhecimento em garrafa começa desde o engarrafamento do vinho e só termina no seu consumo (Cassino *et al.*, 2019). Todo este processo pode levar semanas ou até mesmo décadas (Agriopoulou e Stamatelopoulou, 2017). Durante o processo de envelhecimento o vinho vai evoluindo em termos de cor, sabor e aroma. A velocidade destas evoluções é variável, dependendo da composição inicial do vinho e das condições de armazenamento do mesmo (Cassino *et al.*, 2019). Essencialmente, durante este processo, o vinho pode passar por três fases. Na primeira fase o vinho encontra-se em maturação, podendo surgir flutuações na sua qualidade. Na segunda fase atinge o seu pico de qualidade e, por último, na terceira ocorre um declínio das suas propriedades organoléticas (P. Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.4.1. Impacto do envelhecimento na cor

A cor do vinho é um dos principais determinantes de qualidade (Jackson, 2014). A sua intensidade permite inferir sobre a sua extração e a sua estrutura, já a sua tonalidade é indicativa do envelhecimento e grau de oxidação do vinho (Kennedy, 2010; Jackson, 2014).

1.4.1.1. A cor nos vinhos tintos

A cor do vinho tinto é extremamente dependente do teor em antocianinas (Jackson, 2016). Estas são provenientes da uva, principalmente na película contudo em castas tintureiras estas também se encontram na polpa (Sacchi *et al.*, 2005).

As antocianinas, dependendo do pH, podem encontrar-se em diferentes formas de equilíbrio, visíveis na Figura 3. O pH do vinho (3-4) favorece principalmente a forma pseudo-base carbinol, a qual é incolor, e em seguida a forma de catião *flavilium*, a qual

possui uma coloração avermelhada (Kennedy, 2010; Waterhouse *et al.*, 2016). A percentagem relativa de cada forma tem uma grande influência na cor do vinho (Waterhouse *et al.*, 2016).

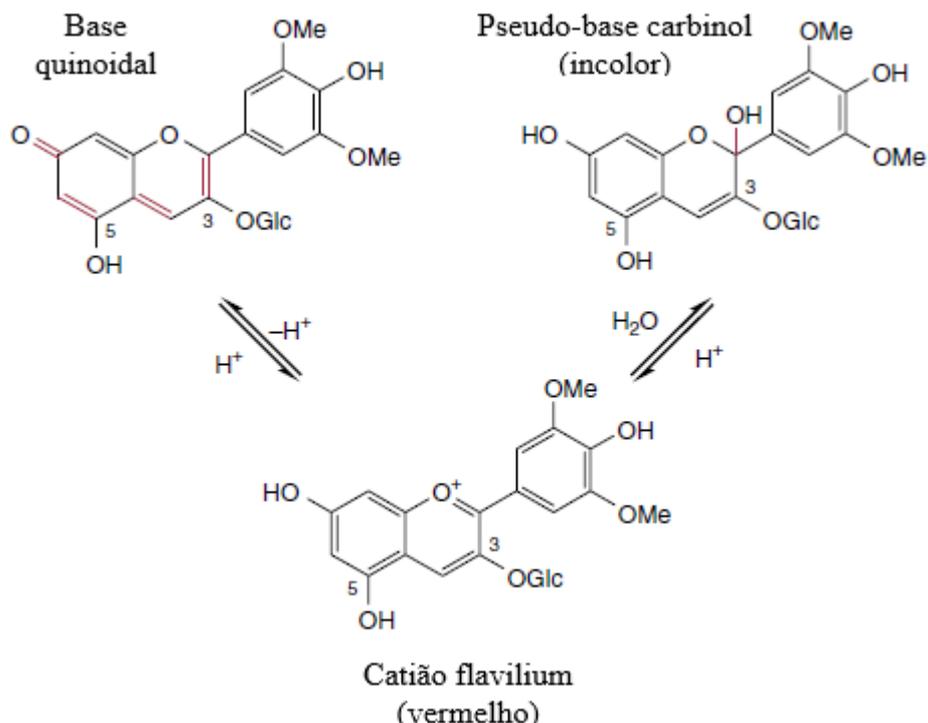


Figura 3- Formas de equilíbrio das antocianinas (Adaptada de Waterhouse *et al.*, 2016)

A cor dos vinhos é também influenciada por fenômenos intermoleculares como a copigmentação. Este fenômeno contribui entre 30 a 50% para a cor dos vinhos novos (Bimpilas *et al.*, 2016). A copigmentação em vinhos consiste na formação de complexos entre antocianinas monoméricas e moléculas denominadas de cofatores. Esta associação permite a estabilização da cor na medida em que os complexos formados devem-se a interações hidrofóbicas, originando uma estrutura em forma de camada (Figura 4), que impede a hidratação dos cationes *flavilium* e conseqüente formação de formas incolores (Bimpilas *et al.*, 2016; Kennedy, 2010; Waterhouse *et al.*, 2016).

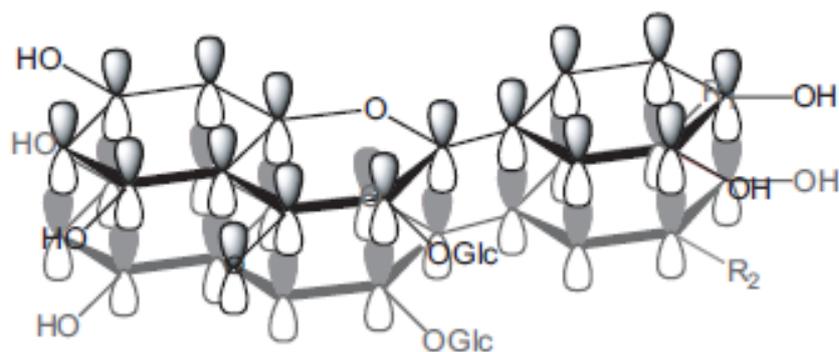


Figura 4-Complexo de copigmentação (Kennedy, 2010)

Anteriormente ao envelhecimento a cor do vinho tinto tem uma tonalidade vermelha-púrpura e com o passar do tempo esta vai mudando para uma tonalidade mais vermelha alaranjada (Jackson, 2014; Waterhouse *et al.*, 2016). A tonalidade altera-se à medida que os complexos de copigmentação se quebram, se originam novos pigmentos e à medida que as antocianinas e as proantocianinas se vão polimerizando em complexos antocianina-tanino (complexos A-T) e complexos tanino-tanino (Jackson, 2014), dando origem a pigmentos mais estáveis (Waterhouse *et al.*, 2016).

As reações de polimerização iniciam-se após a fermentação e, durante o envelhecimento em garrafa, podem ocorrer segundo dois mecanismos distintos: condensação entre antocianinas e taninos, a qual origina complexos A-T, e condensação direta de taninos (Waterhouse *et al.*, 2016).

O mecanismo de polimerização que mais parece ter impacto, na estabilização da cor durante o envelhecimento, é a polimerização direta dos taninos, uma vez que, embora seja lenta, esta reação é contínua (Jackson, 2014). Esta reação dá-se de forma espontânea no vinho, à temperatura ambiente, e deve-se a ligações interflavânicas entre os carbonos C4-C8 ou C4-C6 (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

As reações de condensação entre antocianinas e taninos ocorrem entre a forma catião *flavilium* das antocianinas, que atuam como eletrófilos, e os flavanóis, que, por possuírem os carbonos C6 e C8 parcialmente carregados negativamente, atuam como nucleófilos. Este primeiro passo dá origem a um complexo intermediário, um flaveno incolor, que por oxidação dá novamente origem à forma *flavilium* e esta, por sua vez e por desidratação, dá origem a um catião *xantilium* (laranja avermelhado) (Fulcrand *et al.*, 2006)

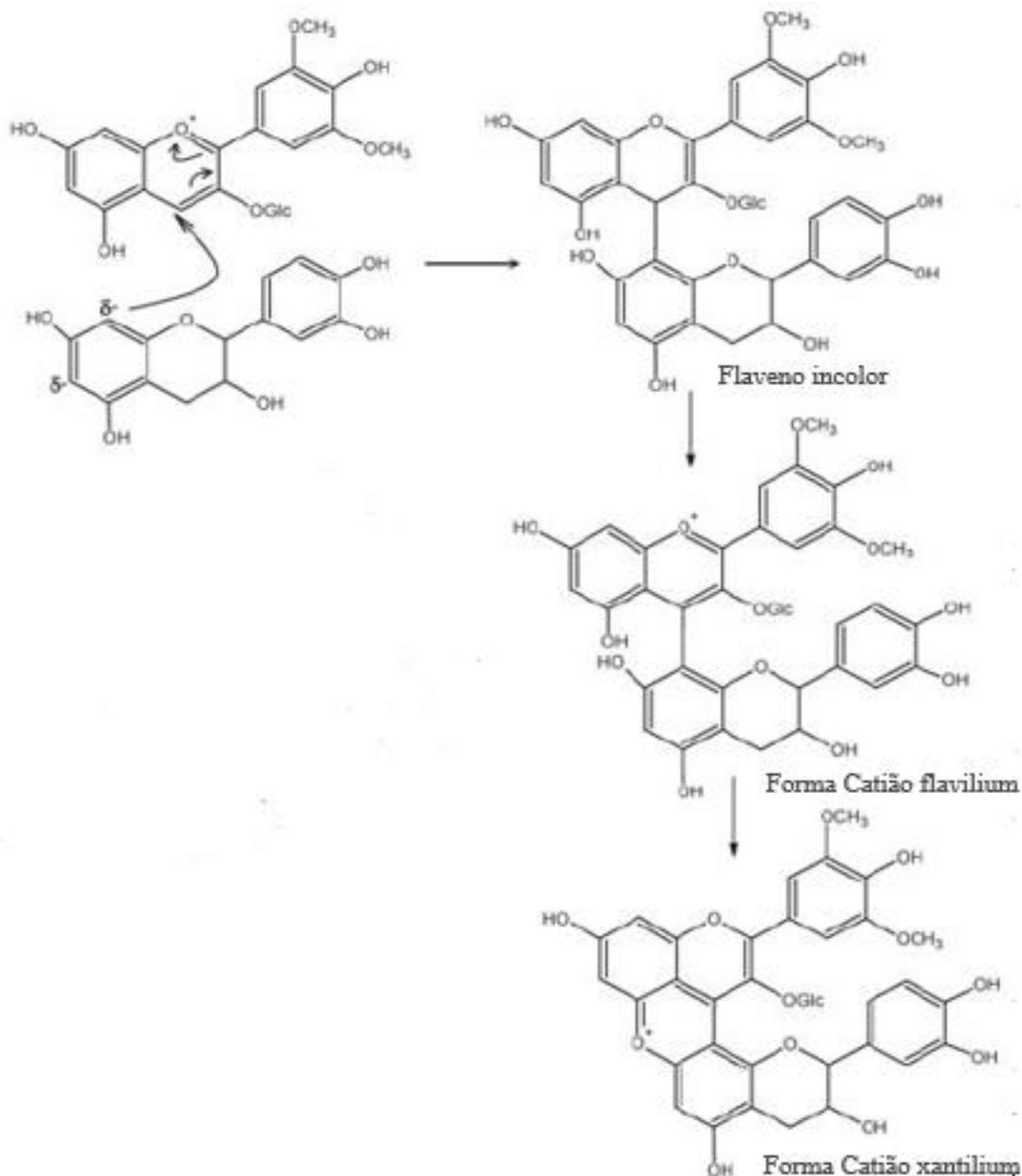


Figura 5- Esquema representativo do mecanismo de condensação antocianina-tanino (Adaptada de (Fulcrand *et al.*, 2006))

A polimerização pode ainda ser influenciada pela peroxidação de compostos di-hidroxifenólicos, mais precisamente de o-difenóis. A peroxidação dá origem a diquinonas que, por sua vez, polimerizam a o-difenóis oligoméricos. Estas reações podem-se repetir, dando origem a compostos fenólicos poliméricos oxidados progressivamente maiores e com uma pigmentação amarelada. Por fim, polifenóis sem cor ou polifenóis amarelados podem ser formados pela ligação entre catequinas e outros grupos fenólicos catalizados

pelo ácido glicolítico que, por sua vez é originado a partir da oxidação do ácido tartárico (Jackson, 2014).

1.4.1.2. A cor nos vinho brancos

A cor dos vinhos brancos deve-se à combinação entre a composição da polpa, principalmente em compostos fenólicos, e as condições a que estes são expostos ao longo da vinificação. Apenas se tem em conta a composição da polpa porque a película e as grainhas são removidas antes da fermentação. Quanto menor o tempo de contacto entre a polpa e a película/grainha, menor é a tonalidade amarelada do vinho (Kennedy, 2010).

Os principais compostos fenólicos em vinhos brancos são os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido p-cumárico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sinapínico. É a oxidação destes compostos fenólicos que origina a tonalidade amarelada dos vinhos brancos e que provoca o escurecimento do mesmo durante o envelhecimento. Numa fase inicial do processo de vinificação este processo de oxidação é mediado por uma enzima, a polifenoloxidase da uva (PPO) (Kennedy, 2010), contudo após a fermentação a oxidação não é mediada por enzimas, mas sim originada por oxidação química dos polifenóis (Recamales *et al.*, 2006). Na Figura 6 é passível a observação do primeiro mecanismo de oxidação mencionado em cima. Neste mecanismo, a oxidação dos compostos fenólicos dá origem a quinonas, que por sua vez são capazes de se condensar com outros compostos, quer fenólicos, quer não fenólicos, e dar origem a pigmentos amarelos. Este processo pode ser atenuado devido às glutatonas que reagem com as quinonas e dão origem a complexos incolores. Contudo, mesmo este complexo pode originar pigmentos amarelos. O complexo incolor pode ser oxidado por lacases e mais tarde dar origem a pigmentos amarelos (Kennedy, 2010; Li *et al.*, 2008).

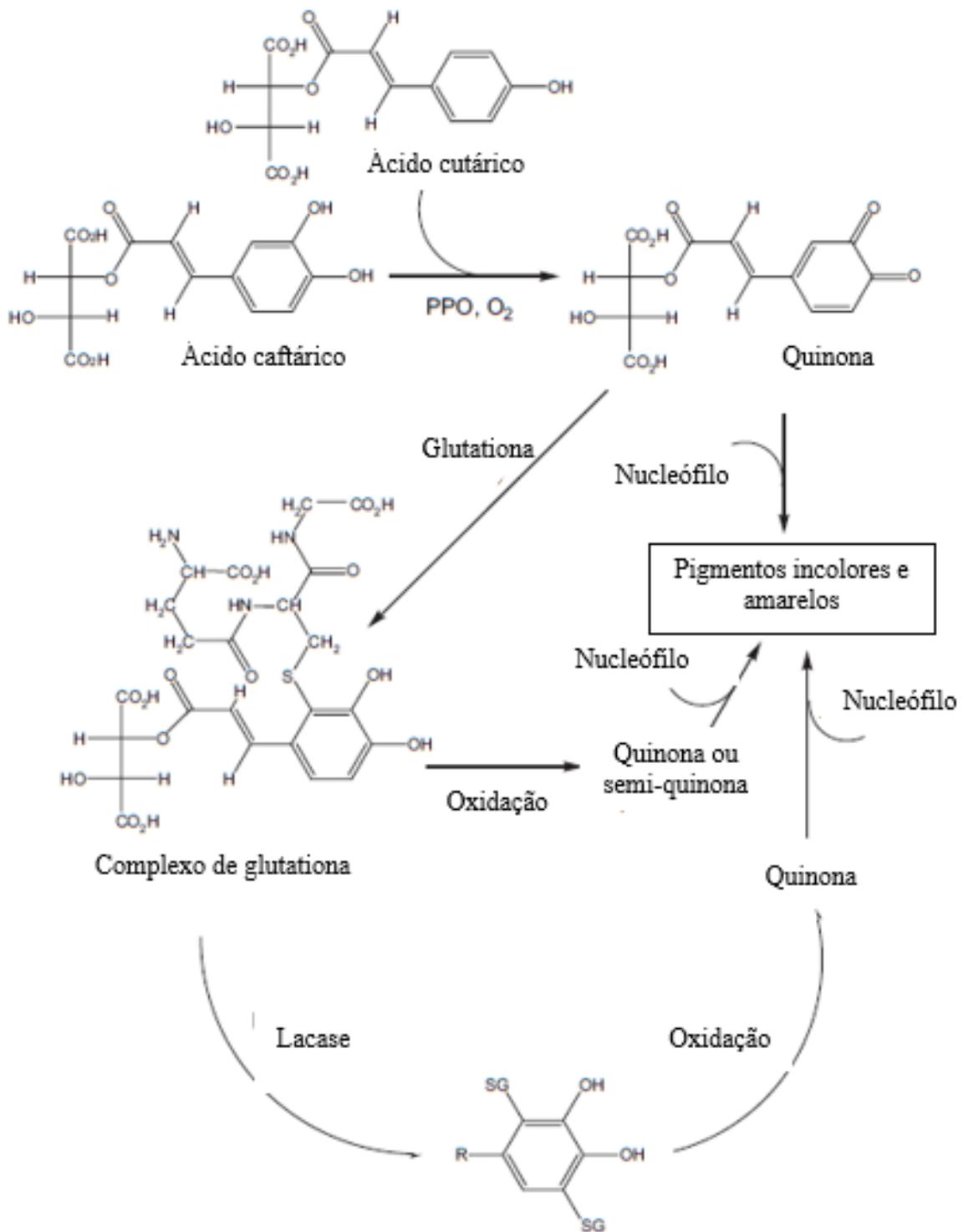


Figura 6- Esquematização da formação de compostos coloridos em vinhos brancos (Adaptada de Waterhouse *et al.*, 2016)

Após a fermentação, o mecanismo de escurecimento por oxidação deixa de ser mediado pela PPO e a oxidação segue uma via não enzimática, catalisada por metais como o cobre e o ferro (Kennedy, 2010; Li *et al.*, 2008).

1.4.2. Alterações do sabor e do aroma

A apreciação organolética do vinho, à parte da questão visual, deve-se a interações entre o aroma e a sensações gustativas. As sensações gustativas englobam quer o sabor, quer as sensações táteis que um vinho gera (Rapp e Mandery, 1986). Posto isto, o envelhecimento em garrafa pouco afeta o sabor do vinho. Contudo, referente às sensações táteis, há uma perda na adstringência devido a alterações de reatividade e precipitação das proantocianinas e antocianinas durante a sua polimerização. Numa fase inicial do envelhecimento poderá também ocorrer um pico de adstringência devido à maior capacidade de ligação com proteínas presentes na boca que os taninos de grande e médio tamanho possuem. Este fenómeno tende a diminuir à medida que os taninos vão precipitando (Jackson, 2014).

Os aromas do vinho podem ser classificados como primários secundários e terciários, dependendo da sua origem. Os aromas primários são também denominados de varietais. Estes aromas são exclusivos de algumas castas (Baumes, 2009) e devem-se a compostos como monoterpenos e norisoprenóides que se encontram em concentrações superiores (Fischer, 2007). Já o aroma secundário deve-se a aromas desenvolvidos durante a fermentação e os classificados como terciários derivam do estágio, quer em contacto com madeira, quer em garrafa (Rapp e Mandery, 1986).

O vinho ao longo do armazenamento em garrafa vai perdendo os seus aromas frutados, isto deve-se essencialmente à perda de compostos voláteis (Linsenmeier *et al.*, 2010). Um dos principais compostos que afeta a fragância do vinho são os ésteres, estes formam-se principalmente durante as fermentações (Jackson, 2016; Jackson, 2014). Estes compostos podem tanto diminuir como aumentar ao longo do envelhecimento, uma vez que estes tendem para um equilíbrio para com os seus constituintes, isto é alcóois e ácidos (Zoecklein *et al.*, 1999). O acetato e esterres etílicos de ácidos gordos de cadeia linear, ésteres produzidos pelo metabolismo microbiano durante as fermentações, estão presentes em quantidades bem acima do valor de equilíbrio, em vinhos novos e por isso durante o envelhecimento são hidrolisados até a sua concentração atingir o valor de equilíbrio (Jackson, 2016; Jackson, 2014; Linsenmeier *et al.*, 2010). Alguns ésteres como etil-lactato, etil-acetato, dietil-malato, dietil-succinato e etil-monosuccinato podem ainda aumentar a sua concentração, durante o envelhecimento, através de reações de esterificação

(Linsenmeier *et al.*, 2010).

Os terpenos são outra família de componentes que afetam o aroma do vinho, principalmente de vinhos originários da variedade Moscatel (Linsenmeier *et al.*, 2010). Alguns dos compostos que compõem este grupo são o linalol, geraniol e diendiol-1. Estes durante o envelhecimento oxidam, resultando na perda de aroma varietal (Jackson, 2014).

Os compostos norisoprenóides oferecem determinados aromas característicos de vinhos envelhecidos. O 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN), composto resultante da degradação de carotenoides é um bom exemplo disso, uma vez que, este, confere o aroma a petróleo característico de determinados vinhos (Linsenmeier *et al.*, 2010).

Os aldeídos são outro grupo de compostos que alteram o aroma do vinho (Culleré *et al.*, 2007). Deste grupo, o mais notável é o acetaldeído. Este forma-se a partir da oxidação do etanol e, no vinho, reduz o aroma através de reações de oxidação. Em baixas concentrações este composto aumenta o sabor frutado do vinho, contudo elevadas concentrações do mesmo conferem, ao vinho, um aroma de noz e em casos extremos um aroma a maçã pútrida (Jackson, 2014; Linsenmeier *et al.*, 2010; Waterhouse *et al.*, 2016). Contudo, este composto tem pouco impacto no aroma em condições normais de armazenamento (Silva Ferreira *et al.*, 2002; Culleré *et al.*, 2007). Outro aldeído capaz de afetar o aroma é o (E)-2-nonenal. Este último proporciona um aroma a madeira, sendo este um aroma indesejado (Linsenmeier *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos voláteis também se alteram ao longo do envelhecimento. Estes compostos são originários do metabolismo microbiano e da hidrólise de fenóis derivados da maturação em madeira de carvalho (Linsenmeier *et al.*, 2010). Ao longo do envelhecimento em garrafa os fenóis voláteis vão-se convertendo em fenóis não voláteis. (Jackson, 2014). Os compostos fenólicos voláteis, dependendo do composto em questão, podem provocar aromas semelhantes a fumo, baunilha, couro, pimenta e produtos medicinais (Waterhouse *et al.*, 2016).

1.5. Engarrafamento

O engarrafamento é o último passo na produção do vinho (Basso *et al.*, 2018) . Este é um processo de extrema importância e tem associados vários riscos podendo colocar em causa todo o processo de produção (Strobl, 2019). O engarrafamento envolve

essencialmente quatro passos, entre eles o enxaguamento, o enchimento e o rolhamento (Basso *et al.*, 2018; Strobl, 2019). Na Figura 7 é visível este processo de forma mais detalhada.

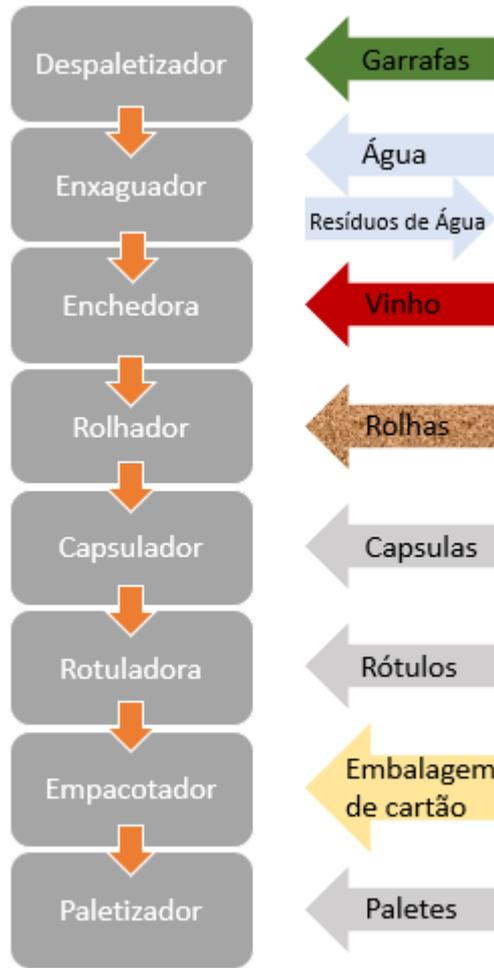


Figura 7 - Processo de engarrafamento da Global wines

Durante o processo de engarrafamento e anteriormente ao enchimento propriamente dito, as garrafas são enxaguadas por dentro. Em grandes linhas de enchimento este processo é executado por uma enxaguadora que agarra a garrafa, através de pinças, e inverte-a de modo a permitir que a água escorra na totalidade. O passo seguinte numa linha é o enchimento. Geralmente nas enchedoras o vinho passa por gravidade para as garrafas e estas podem possuir um sistema de vácuo, que permite regular o nível de enchimento. Após o enchimento a garrafa é fechada na rolhadora e as garrafas seguem para a capsuladora ou podem ser primeiramente armazenadas, como produto semi-acabado, para,

mais tarde, continuar o processo. No fim as garrafas são embaladas (Strobl, 2019).

Sendo o engarrafamento o último passo entre a produção e o consumo, este possui vários riscos que podem potencialmente afetar o consumidor, quer estejamos a falar em segurança ou qualidade alimentar. Relativamente à qualidade alimentar, o principal risco é microbiológico. O vinho pronto a ser engarrafado, por si só, já evita a contaminação de várias espécies de alteração, uma vez que possui um pH baixo e um teor alcoólico alto e para complementar o baixo contacto com oxigénio durante o enchimento também reduz a probabilidade de contaminação (Strobl, 2019). Como visto anteriormente existem diversos métodos de inibição microbiológica, contudo, para evitar uma recontaminação, todos os locais em contacto com o vinho, durante o enchimento, devem ser higienizados (Marriott e Gravani, 2006).

Contaminações também têm que ser tidas em conta nesta fase do processo. Os contaminantes físicos provêm principalmente de partículas de vidro, que podem entrar nas garrafas quando alguma garrafa parte. Este é o maior risco em termos de segurança alimentar, durante este processo. Contudo, poeiras e outros objetos podem contaminar as garrafas (Strobl, 2019).

Os produtos usados durante a higienização são potenciais fontes de contaminação. Os produtos mais usadas são desinfetantes, ácidos e substâncias causticas.

1.6. Higienização

Como visto anteriormente, durante o processo de vinificação há um grande cuidado na inativação de microorganismos indesejáveis, já que estes podem deteriorar as propriedades organolépticas do vinho (Seiter, 1984). Embora se usem os mais diversos métodos de inativação destes, há sempre a possibilidade de recontaminarem o vinho, através de contaminações cruzadas. Deste modo, há que assegurar boas práticas de higiene. O conceito de higiene subdivide-se em limpeza e desinfecção. O primeiro consiste na remoção de detritos e material tanto mineral como orgânico e o segundo pressupõe a redução da população microbiana viável para níveis aceitáveis (Fugelsang, 1997; Zoecklein *et al.*, 1995; Duarte *et al.*, 2011). Para além disto, a desinfecção ainda permite eliminar zonas de potencial crescimento microbiano (Marriott e Gravani, 2006).

A necessidade de desinfecção embora seja superior na zona de engarrafamento, esta é necessária ao longo de todo o processo de vinificação, até mesmo na produção agrícola (Marriott e Gravani, 2006). Os principais focos de contaminações são a matéria-prima, a fonte de água e ar, os recipientes de engarrafamento, pragas, material que entra em contacto com o vinho/mosto, estado do equipamento, instalações e as pessoas que entram em contacto direto com o produto. Existindo tantas fontes potencialmente prejudiciais para a qualidade do vinho é necessário possuir procedimentos de higienização claros, instruir as pessoas intervenientes na vinificação, ter atitudes corretas perante o processo de higienização e possuir um programa de monitorização de contaminações (Seiter, 1984).

Para a limpeza inicial são utilizados detergentes, estes têm por objetivo dispersar e dissolver detritos (Fugelsang, 1997; Seiter, 1984). Os principais detergentes utilizados são compostos alcalinos, como por exemplo KOH e NaOH. Estes para além de efeito detergente, também possuem um efeito microbiano. Um dos grandes problemas é que alguns dos compostos alcalinos são corrosivos até mesmo para equipamentos de aço inoxidável, caso a concentração limite recomendada seja ultrapassada. Em várias formulações de detergentes são adicionados agentes quelantes e surfatantes. O primeiro permite o sequestro de cálcio e magnésio e previnem a sua precipitação. Já os surfatantes são utilizados para reduzir a tensão superficial entre o detergente e a superfície. Formulações específicas podem ainda conter ácidos, estes permitem reduzir os depósitos minerais, contudo são corrosivos até mesmo para aço inoxidável (Fugelsang, 1997).

A desinfecção pode ser atingida quer por vapor de água, quer pelo uso de compostos químicos. Os compostos químicos mais utilizados são compostos de amónio quaternário e formulações com cloro, iodo ou ácidos (Seiter, 1984; Weise et al., 1988). Os primeiros atuam através da ruptura das membranas celulares. As soluções de desinfecção que contêm iodo são geralmente denominadas iodoforas e possuem também surfatantes. O princípio ativo destas formulações é o iodo molecular (I_2) e por esse motivo atuam melhor quando com pH entre os 4 e 5. Soluções baseadas em cloro são um poderoso agente antimicrobiano e oxidante que, possuem como princípio ativo o ácido hipoclorídrico (HOCl) (Duarte et al., 2011). Quanto às formulações ácidas, um bom exemplo de um ácido utilizado em operações de desinfecção é o ácido peracético (PAA). Este ácido é comercializado em misturas compostas por ácido acético, ácido peracético, peróxido de hidrogénio e água. O PAA é um ácido com atividade antimicrobiana muito elevada, tendo

atividade mesmo em pequenas concentrações. Acredita-se que o modo de ação deste composto seja através da libertação de espécies reativas de oxigênio, que provocam a oxidação de ligações de enxofre e dissulfeto de proteínas, enzimas e outros metabolitos (Kitis, 2004).

Na utilização de qualquer formulação de sanitização deve sempre haver precaução pois podem provocar corrosão dos equipamentos e pode pôr em causa a saúde das pessoas intervenientes (Fugelsang, 1997). No uso de qualquer químico deve-se ter em conta os riscos ecológicos, a produção de aromas, corrosão e a facilidade de enxaguamento e remoção dos mesmos (Duarte *et al.*, 2011).

1.7. Controlo de qualidade dos vinhos

Como visto anteriormente o vinho é um alimento quimicamente complexo. Os processos e alterações a que está sujeito podem interferir diretamente na sua qualidade. Deste modo, a OIV possui um conjunto de métodos que permitem a análise de determinados parâmetros físico-químicos, tais como o teor alcoólico, acidez volátil, acidez total, pH e anidrido sulfuroso, que em conjunto com a análise sensorial permitem aferir sobre a qualidade e evolução dos vinhos ao longo do seu processo de produção e envelhecimento.

O teor alcoólico é considerado por muito consumidores um fator de qualidade no vinho. Aliás, o tipo de vinho varia consoante o seu conteúdo em álcool. Este composto tem ainda propriedades desinfetantes, algo bastante valorizado aquando do envelhecimento. O seu valor tem de ser controlado ao longo do tempo, uma vez que pode ser indicador de alterações do vinho (por exemplo, por fermentação de açúcares que não tenham sido consumidos durante a fermentação alcoólica). Além disso, é um parâmetro legal que tem de constar na rotulagem do vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A acidez volátil é também um fator bastante importante a ter em conta. O principal composto envolvido neste parâmetro é o ácido acético, resultante essencialmente da atividade de bactérias acéticas. A presença de ácido acético está legislada e a sua evolução ao longo do tempo pode ser indicadora de um problema de conservação do vinho (P. Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A acidez total é o aglomerado de todos os ácidos constituintes do vinho, quer sejam orgânicos ou inorgânicos. Os valores normais de acidez total é de 5-8g/L e 6-9g/L em vinhos tintos e brancos, respetivamente. A acidez total deve ser analisada pois este parâmetro contribui para caracterização do vinho e é facilmente relacionável com a análise sensorial (Waterhouse *et al.*, 2016)

O pH do vinho varia normalmente entre 3 e 4. Um pH próximo de 3 influencia a estabilidade microbiológica, diminuindo o número de organismos capazes de se desenvolver e ainda tem um efeito positivo na atividade antissética do SO₂. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006)

Como referido anteriormente o dióxido de enxofre é regularmente utilizado ao longo do processo de produção de vinho. Devido principalmente à sua atividade antimicrobiana e antioxidante (Cosme *et al.*, 2017; Escott *et al.*, 2017; Fugelsang, 1997; Santos *et al.*, 2012) Contudo a sua concentração é estritamente regulada pois pode provocar reações alérgicas e intolerâncias alimentares. Na União Europeia os vinhos apenas podem conter no máximo 150 mg/L, no caso dos vinhos tintos e 200 mg/L nos vinhos brancos (Regulamento EU n.º 606/2009).

Extrato seco refere-se ao conjunto de compostos não voláteis existentes no vinho. Este é um parâmetro legal que varia consoante o teor alcoólico, a concentração de açúcares e a acidez volátil e pode ser utilizado como indicador da qualidade da uva e da vinificação (Rizzon e Miele, 1996).

Uma concentração de açúcares redutores assegura uma maior estabilização microbiológica (Waterhouse *et al.*, 2016).

A turbidez é analisada pois pode ser indicadora de alterações na estabilidade proteica, fenólica, tartárica e microbiológica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006)

2. Objetivos

A Global wines, empresa na qual este estudo se realizou, é uma empresa produtora de vinhos com um forte desejo de entregar produtos de elevada qualidade aos seus clientes e consumidores. Deste modo a empresa tem e procura investir cada vez mais no setor de inovação e qualidade de modo a não só melhorar os seus produtos, mas também reduzir os custos de produção. Assim os objetivos do presente trabalho são:

Primeiramente procurou-se a integração em contexto empresarial. Nesta fase foi essencial o desenvolvimento de certas competências como o trabalho em equipa, a organização e a comunicação. Nesta fase pretendeu-se também desenvolver conhecimento sobre a produção de vinho e sobre métodos laboratoriais, quer os necessários para o presente estudo, quer para os métodos necessários no dia a dia de um laboratório especializado na área de enologia.

Para o estudo em si, pretendeu-se primeiramente compreender se a velocidade de enchimento de vinho tinto influenciaria de tal modo o tempo de exposição à pasteurização flash, que poria em causa a qualidade do produto final. Por qualidade refiro-me às suas características físico-químicas e sensoriais. Embora não espectável neste estudo também se avaliou-se se haveria ou não impacto na estabilização microbiológica. Esta comparação de velocidades tem por objetivo estudar a possibilidade de aumentar a produção sem afetar a qualidade do produto.

Neste trabalho também se comparou a eficiência de técnicas de estabilização microbiológica, mais concretamente da pasteurização flash e da filtração, em vinho tinto, rosé e branco. Em complementaridade também se avaliou a evolução dos compostos fenólicos por meios de análises físico-químicas durante 105, 104, 69 dias o vinho rosé, branco e tinto, respetivamente. Avaliaram-se ainda as diferenças sensoriais, através de provas sensoriais, entre amostras dos diferentes vinhos. Estes ensaios têm por objetivo determinar a possibilidade de utilizar diferentes métodos de estabilização microbiológica sem afetar a qualidade do vinho. Isto permitirá à empresa determinar a possibilidade de utilização da técnica (pasteurização flash ou filtração) que desejar, tendo em vista um aumento de produção ou uma redução de custos associados.

3. Metodologia

3.1. Recolha de amostras

Para o presente estudo, recolheram-se as amostras em quatro ensaios distintos, todos com o objetivo de recolher amostras expostas a diferentes metodologias de estabilização microbiológica. Em três dos ensaios recolheram-se amostras quer expostas a filtração, quer à pasteurização flash (90 °C) variando apenas, entre cada ensaio, o tipo de vinho, sendo que num dos ensaios recolheram-se amostras de vinho branco (VB), noutro de rosé (VR) e no outro de vinho tinto (VT). No ensaio restante testaram-se diferentes velocidades de enchimento de forma a averiguar o seu impacto na estabilização microbiológica. Os esquemas dos ensaios encontram-se nas Figuras 7,8,9 e 10.

No primeiro ensaio (Figura 7) expôs-se vinho tinto a variações de temperatura de pasteurização provocadas pela alteração da velocidade de enchimento da linha de produção. Testaram-se três velocidades diferentes (3000, 3800 e 4500 garrafas/hora) e em cada velocidade recolheram-se 250 garrafas. Todo o ensaio foi realizado com a linha de enchimento em permanente funcionamento e a troca de modalidade efetuou-se pelo aumento da velocidade da linha. Em cada modalidade, a linha de produção trabalhou durante uma hora e, durante esse período, a cada dez minutos observaram-se as temperaturas em diferentes pontos. Recolheram-se as amostras 10 minutos após o primeiro ciclo de medições de cada modalidade. Recolheram-se ainda 40 litros de vinho não pasteurizado e mais tarde engarrafou-se este vinho manualmente, filtrando-o primeiro com filtro de 0,65 µm.

Esquema do Ensaio

Rejeitar os primeiros 20 minutos de garrafas após o início de uma nova modalidade

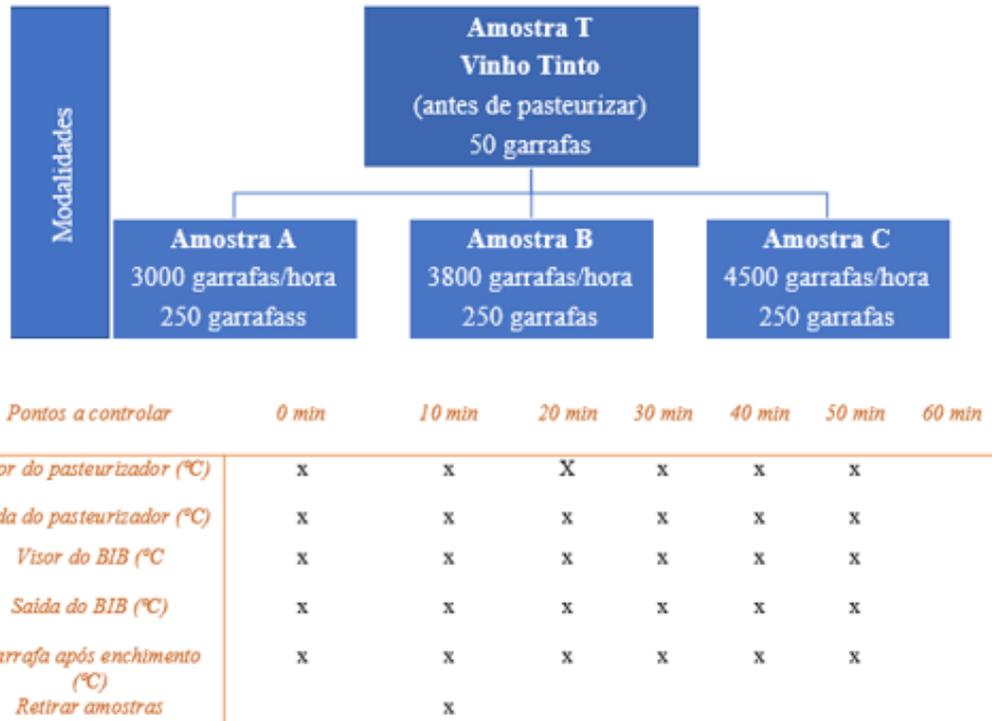


Figura 8: Esquema do ensaio no qual se variou a velocidade de enchimento da linha de produção.

O *design* dos ensaios nos quais se recolheram amostras de vinho branco e de vinho rosé é muito semelhante. Recolheram-se 250 amostras de três modalidades diferentes, vinho filtrado por filtro com poros de 0,45 µm e vinho pasteurizado com enchimento a frio e a quente. As amostras de cada modalidade recolheram-se dez minutos após a medição da temperatura em diferentes pontos. No final de cada modalidade mediram-se novamente as temperaturas nos mesmo locais. Em cada ensaio recolheu-se ainda vinho (40 L) sem qualquer tipo de estabilização, sendo este depois engarrafado de forma manual.

Esquema do Ensaio

Rejeitar os primeiros 20 minutos de garrafas após o início de uma nova modalidade

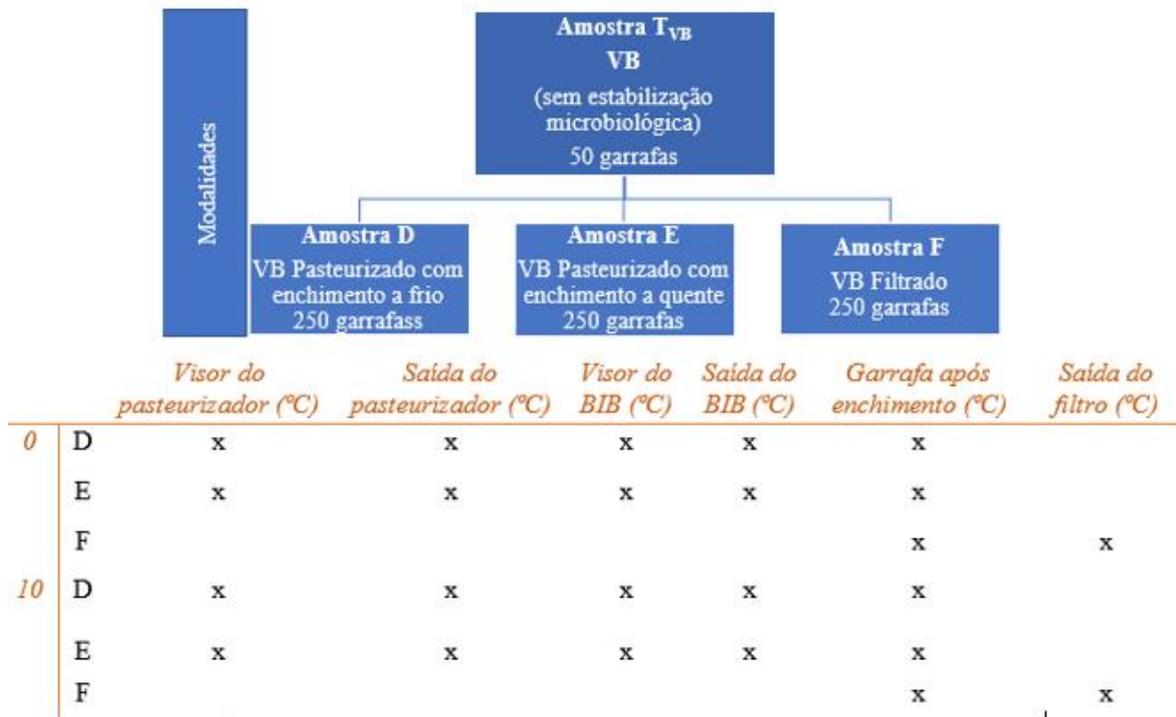


Figura 9: Esquema do ensaio no qual se retiraram amostras de vinho branco exposto a diferentes metodologias de estabilização microbiológica pré-engarrafamento.

Rejeitar os primeiros 20 minutos de garrafas após o início de uma nova modalidade

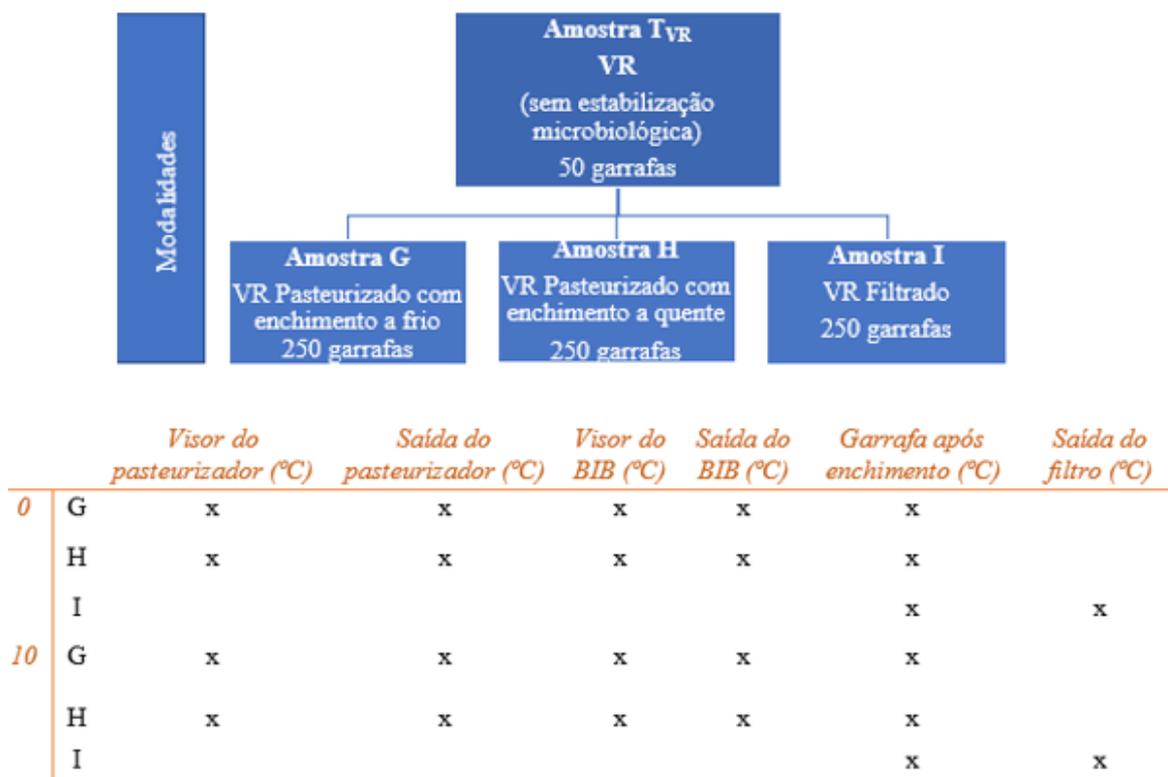
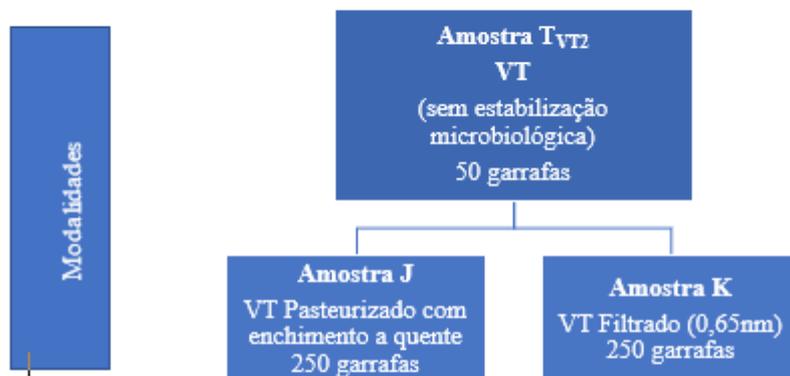


Figura 10: Esquema do ensaio no qual se retiraram amostras de vinho rosé exposto a diferentes metodologias de estabilização microbológica pré-engarrafamento.

No quarto ensaio, Figura 10, recolheram-se amostras de vinho tinto. Neste ensaio recolheram-se 3 tipos de amostra diferentes. Numa das modalidades recolheram-se 250 garrafas de vinho filtrado num filtro com porosidade de 0,65 μm . Noutra recolheram-se 250 garrafas de vinho pasteurizado a 90 °C e com enchimento a quente. Recolheram-se ainda 40 litros de vinho sem estabilização microbológica e engarrafaram-se 50 garrafas manualmente, filtrando o mesmo primeiramente com filtro com porosidade de 0,65 μm .

Esquema do Ensaio

Rejeitar os primeiros 20 minutos de garrafas após o início de uma nova modalidade



		<i>Visor do pasteurizador (°C)</i>	<i>Saída do pasteurizador (°C)</i>	<i>Visor do BIB (°C)</i>	<i>Saída do BIB (°C)</i>	<i>Garrafa após enchimento (°C)</i>	<i>Saída do filtro (°C)</i>
<i>0</i>	J	x	x	x	x	x	
	K					x	x
<i>10</i>	J	x	x	x	x	x	
	K					x	x

Figura 11: Esquema do ensaio no qual se retiraram amostras de vinho tinto exposto a diferentes metodologias de estabilização microbiológica pré-engarrafamento.

Armazenaram-se todas as amostras em condições semelhantes, num local com pouca iluminação e à temperatura ambiente.

3.2. Análises

Após cada ensaio fizeram-se, ainda na mesma semana, análises físico-químicas e microbiológicas às amostras. Estas análises e a análise sensorial fizeram-se novamente uma semana após as primeiras análises. A partir daí as análises físico-químicas e microbiológicas fizeram-se mensalmente e a análise sensorial de dois em dois meses. As análises feitas a cada amostra encontram-se expostas na tabela 3.

Tabela 3: Análises realizadas em cada amostra.

<i>Amostras</i>	<i>Análise sumária</i>	<i>S_O₂ L/T</i>	<i>Turbidez</i>	<i>CIELab</i>	<i>Somers</i>	<i>Taninos</i>	<i>Microbiologia</i>	<i>Sensorial</i>
<i>T</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>A</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>B</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>C</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>T_{VB}</i>	x	x	x	x			x	x
<i>D</i>	x	x	x	x			x	x
<i>E</i>	x	x	x	x			x	x
<i>F</i>	x	x	x	x			x	x
<i>T_{VR}</i>	x	x	x	x	x		x	x
<i>G</i>	x	x	x	x	x		x	x
<i>H</i>	x	x	x	x	x		x	x
<i>I</i>	x	x	x	x	x		x	x
<i>T_{VT2}</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>J</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>K</i>	x	x	x	x	x	x	x	x

Legenda: Amostra T- testemunha do teste comparativo de velocidades de enchimento; Amostra A- Vinho engarrafado com enchimento a 3500 garrafas/hora; Amostra B- Vinho engarrafado com enchimento a 4000 garrafas/hora; Vinho engarrafado com enchimento a 4500 garrafas/hora; T_{VB}- testemunha de ensaio em vinho branco; Amostra D- vinho branco pasteurizado com enchimento a frio; Amostra E- vinho branco pasteurizado com enchimento a quente; Amostra F- vinho branco filtrado; Amostra T_{VR} – testemunha do ensaio em vinho rosé; Amostra G- vinho rosé pasteurizado com enchimento a frio; Amostra H- vinho rosé pasteurizado com enchimento a quente; Amostra I- vinho rosé filtrado; T_{VT2}- testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto; Amostra J- vinho tinto pasteurizado; Amostra K- vinho tinto filtrado.

3.2.1 Parâmetros físico-químicos gerais

Parâmetros físico-químicos como o teor alcoólico (TA), a acidez volátil (AV), os açúcares totais (AT), o pH, a massa volúmica (MV), o extrato seco (ES), o ácido láctico (LA), o ácido málico e os açúcares redutores (AR) determinaram-se através da técnica de espectrometria de infravermelhos por transformado de Fourier (FTIR). Aplicou-se esta técnica através do uso do sistema *Bacchus*. Este sistema possui 4 componentes: amostrador automático M.S.U., espectrómetro Nicolet 380 FT-IR (Thermo Electron Corporation), módulo automático eletrónico com função peltier e computador com o programa *Bacchus Acquisition*. O amostrador permite a colocação das amostras desejadas. O módulo automático eletrónico permite o fluxo das amostras entre o amostrador e o FTIR. O FTIR permite a determinação dos parâmetros acima referidos através da irradiação no espectro do infravermelho e visível.

3.2.2 Dióxido de enxofre livre (SO₂L) e total (SO₂T)

Determinou-se o SO₂L por titulação iodométrica direta. Adicionou-se a 50 ml de vinho, num erlenmeyer, 5 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,25M e 3 ml de cozimento de amido a 0,5g/100 ml. Efetuou-se a titulação por adição de solução de iodo a 0,03125 N até haver uma alteração da cor. Obteve-se o teor de enxofre livre através da multiplicação do volume titulado por 20.

O teor de SO₂T obteve-se por titulação iodométrica após oxidação do SO₂L por hidrólise alcalina. A 50 ml da amostra adicionaram-se 10 ml de hidróxido de potássio e aguardou-se 15 minutos. Adicionou-se 10 ml de ácido sulfúrico 0,25M e 3 ml de cozimento de amido a 0,5g/100 ml. Em seguida titulou-se com I₂ a 0,03125 N até se observar uma viragem na cor da solução. Obteve-se o teor de enxofre total através da multiplicação do volume titulado por 20.

3.2.3 Medição da Turbidez e do pH

A turbidez obteve-se através da utilização de um turbidímetro Lovibond, TB300 IR. Para cada amostra leu-se a turbidez duas vezes, no modo leitura da média, existente no equipamento.

O pH obteve-se através da leitura de duas réplicas de cada amostra através de um potenciômetro Hach, sensION^{TM+}.

3.2.4 Análise dos compostos fenólicos

3.2.4.1. Método de Somers (análise dos compostos fenólicos)

Utilizou-se o método de somers (Chris Somers & Evans, 1977) para quantificar, em vinhos tintos e rosés, o índice de fenóis totais, a intensidade de cor, a tonalidade, os pigmentos poliméricos, o índice de polimerização, as antocianinas totais e coradas, os pigmentos totais e o índice de ionização. Leram-se as absorvâncias a 420, 520 e 620 nm de modo a calcular a intensidade de cor, a tonalidade e os pigmentos poliméricos. Para determinar o índice de polimerização, as antocianinas totais e coradas, os pigmentos totais e o índice de ionização leram-se as absorvâncias a 520 após a acidificação do meio com

ácido clorídrico (HCL) (1:100) para vinhos tintos, (1/10) para vinhos rosé. Em seguida leram-se as absorvâncias a 520 nm após a adição em excesso de SO₂. Já o índice de fenóis totais, tanto para vinho tinto como rosé, calculou-se pela leitura das absorvâncias a 280 nm, sendo necessário, porém, uma diluição de 100 vezes em amostras de vinho tinto.

Os cálculos necessários para a obtenção dos parâmetros em cima referidos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Formulas necessárias para calcular o índice de fenóis totais, a intensidade de cor, a tonalidade, os pigmentos poliméricos, o índice de polimerização, as antocianinas totais e coradas, os pigmentos totais e o índice de ionização em vinhos tintos e rosés.

	<i>Vinho tinto</i>	<i>Vinho rosé</i>
<i>Índice de fenóis totais</i>	$A_{280} \times 100$	A_{280}
<i>Intensidade de cor</i>	$(A_{420} + A_{520} + A_{620}) \times 10$	$A_{420} + A_{520} + A_{620}$
<i>Tonalidade</i>	$A_{420} \div A_{520}$	$A_{420} \div A_{520}$
<i>Pigmentos poliméricos</i>	$A_{520_{SO_2}} \times 10$	$A_{520_{SO_2}}$
<i>Índice de polimerização (%)</i>	$\frac{A_{520_{SO_2}} \times 10}{A_{520_{HCL}} \times 101} \times 100$	$\frac{A_{520} - A_{520_{SO_2}}}{A_{520_{HCL}} \times 1,11}$
<i>Antocianinas coradas</i>	$A_{520} - A_{520_{SO_2}}$	$A_{520} - A_{520_{SO_2}}$
<i>Antocianinas totais</i>	$(A_{520_{HCL}} \times 101) \times A_{520_{SO_2}}$	$(A_{520_{HCL}} \times 1,11) \times A_{520_{SO_2}}$
<i>Pigmentos totais</i>	$A_{520_{HCL}} \times 101$	$A_{520_{HCL}} \times 1,11$
<i>Índice de ionização</i>	$\frac{\text{Antocianinas coradas}}{\text{Antocianinas totais}} \times 100$	$\frac{\text{Antocianinas coradas}}{\text{Antocianinas totais}} \times 100$

3.2.4.2 Método da metil-celulose precipitável (MCP)

Utilizou-se este método de forma a quantificar os taninos presentes nas amostras de vinho tinto. O método baseia-se nas interações criadas entre a metil-celulose, que se comporta como um polímero, e os taninos, o que origina complexos insolúveis e que acabam por precipitar.

Para cada amostra prepararam-se duas soluções, em duplicado, uma com a adição de metil-celulose (Sigma Life Science) e a outra sem (amostra controlo). Para as amostras controlo adicionaram-se 2 ml de uma solução saturada de sulfato de amónio a 0,25 ml de

vinho e em seguida adicionaram-se ainda 7,75 ml de água. Homogeneizou-se o preparado e deixou-se a repousar por 10 minutos à temperatura ambiente.

As soluções com metil-celulose, também foram preparadas em duplicado. Em cada solução adicionaram-se 3 ml de metil-celulose a 0,25 ml de vinho. Em seguida homogeneizou-se e deixou-se repousar entre dois a três minutos. Após este período adicionaram-se 2 ml de uma solução saturada de sulfato de amónio e 4,75 ml de água. Voltou-se a homogeneizar e a deixar repousar, desta vez durante 10 minutos.

Centrifugaram-se todas as amostras durante 5 minutos a 4000 rpm e leu-se a absorvância a 280 nm. Para a quantificação propriamente dita usou-se a seguinte formula: $A_{280}(\text{taninos}) = A_{280}(\text{controlo}) - A_{280}(\text{amostra com metil-celulose})$.

De modo a calcular o teor de taninos em miliequivalentes de epicatequina realizou-se uma curva de calibração com cinco soluções de epicatequina (Sigma Life Science) a diferentes concentrações. Para cada concentração fizeram-se três leituras. O gráfico da reta de calibração pode ser consultado no capítulo 6.4.

3.2.4.3 Determinação das características cromáticas

Para medir e quantificar a cor utilizou-se o sistema CIELab. Este sistema assenta na premissa de que a cor do vinho pode ser descrita segundo três atributos, a tonalidade, a intensidade e a cromaticidade. Este sistema transforma estes atributos num sistema de coordenadas cartesianas retangulares, o que traduz com grande precisão a sensibilidade humana em relação à cor.

A luminosidade, representada por L, indica a transmitância, sendo esta inversamente variável à densidade da cor. Os seus valores encontram-se entre o intervalo: 0 (opacidade total) – 100 (completamente transparente). Já a tonalidade, representada por a^* , corresponde à variação entre a cor vermelha ($+a^*$) e a cor verde ($-a^*$) e cromaticidade, b^* , corresponde à variação entre a cor amarela ($+b^*$) e a cor ($-b^*$).

Determinaram-se as coordenadas do espaço CIELab através da leitura das absorvância entre os 400 e os 700nm.

Com os resultados obtidos pelo CIELab avaliou-se a existência de variações, na cor entre amostras, visualmente significantes através do (ΔE). Este parâmetro é calculado a partir da seguinte equação: $(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{0,5}$. Onde, $\Delta L^* = L^*(\text{amostra 1}) - L^*(\text{amostra2})$; $\Delta a^* = a^*(\text{amostra1}) - a^*(\text{amostra 2})$; $\Delta b^* = b^*(\text{amostra1}) - b^*(\text{amostra 2})$.

3.2.5 Análise microbiológica

A análise da estabilização microbiológica dos vinhos realizou-se pela inoculação, em duplicado, de placas com meio específico para bactérias (*WL Diferencial Medium*,) para bolores e leveduras (*WL Nutrient agar*) e em específico para as leveduras *Brettanomyces* (*Brettanomyces agar*). Em seguida incubaram-se as amostras a 35 °C durante 2 dias, isto para bolores, leveduras e bactérias. Para *Brettanomyces* incubou-se a 25 °C durante 8 dias.

3.2.6 Análise sensorial

A análise sensorial realizou-se através de testes descritivos, de dois em dois meses, por um painel de 5 provadores. Nestas análises avaliaram-se parâmetros relacionados com a cor (intensidade da cor, violeta, vermelho, castanho e limpidez para vinhos tintos e rosés; intensidade da cor, cítrico, palha, castanho e limpidez para vinhos brancos) com o aroma (frutado, floral, balsâmico, especiarias, empireumático, sulfurado, vegetal, intensidade, equilíbrio para o vinho tinto; frutado, floral, especiarias, sulfurado, vegetal, intensidade e equilíbrio para vinhos brancos e rosés) e com o sabor (corpo, adstringência. Amargo, acidez, doce, persistência e equilíbrio para vinhos tintos; corpo, amargo, acidez, doce, persistência e equilíbrio para vinhos brancos e rosés). A cada elemento do painel entregou-se uma folha de prova com os parâmetros anteriores a fim de os avaliar de acordo com uma escala de 1 a 10.

3.2.7 - Análise estatística

Procedeu-se à análise dos dados com o auxílio do programa *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)*. Aplicou-se a análise estatística aos resultados obtidos na quantificação dos compostos fenólicos e na análise sensorial. De modo a avaliar a significância das diferenças entre amostras verificou-se primeiro se as amostras dentro de cada ensaio seguiam uma distribuição normal. Dependendo da sua distribuição aplicou-se a análise descritiva de variância (ANOVA) (distribuição normal) e para as variáveis que não seguiam uma distribuição normal aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Determinou-se a significância estatística segundo o p-value, sendo que para p-values inferiores a 0,05 considerou-se haverem diferenças significativas entre amostras.

4. Resultados e Discussão

No seguinte capítulo encontram-se expostos os resultados das análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais realizadas às amostras de vinho tinto, rosé e branco. Inicialmente são expostos os resultados da caracterização sumária de todos os vinhos. Os resultados das análises aos compostos fenólicos e à cor, as análises microbiológicas e as análises sensoriais serão expostas posteriormente. Uma vez que o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos das metodologias de estabilização microbiológica nos diferentes tipos de vinhos dividiram-se os restantes resultados em quatro partes. Assim, primeiramente serão expostos os resultados referentes ao ensaio no qual se aplicaram diferentes velocidades de enchimento de vinho tinto sucedendo-se o ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinhos tintos. Após os resultados obtidos para vinhos tinto, encontram-se os resultados para vinho rosé e por fim os resultados para vinho branco.

4.1. Caracterização dos vinhos

Com o intuito de obter uma caracterização sumária dos vinhos, foram analisados os seguintes parâmetros: teor alcoólico, a acidez volátil, a acidez total, o pH, a massa volúmica, o extrato seco, o teor em açúcares redutores, a turbidez e o teor em dióxido de enxofre livre e total foram analisados de modo a obter uma caracterização sumária dos vinhos utilizados. Os resultados obtidos para estes parâmetros encontram-se nas Tabelas 5,6 e 7 e nas Figuras 12, 13 e 14.

A caracterização sumária é essencial para a caracterização qualitativa global do vinho. Estas análises retratam não só as propriedades organolépticas, mas também são indicadoras de estabilidade microbiológica do vinho.

Tabela 5: Caracterização sumária do vinho tinto utilizado no estudo

<i>Parâmetros analisados</i>	<i>Resultados</i>	
<i>Teor alcoólico (%v/v)</i>	13.0	13.0
<i>Acidez total (g/L)</i>	5.3	5.4
<i>Ph</i>	3,72	3,72
<i>Massa Volúmica (g/mL)</i>	0.9949	0.9949
<i>Extrato seco (g/L)</i>	35.2	35.2
<i>Açúcares redutores (g/L)</i>	6.9	6.9
<i>Turbidez (NTU's)</i>	3.37	3.37

Tabela 6: Caracterização sumária do vinho rosé utilizado ao longo do estudo

<i>Parâmetros analisados</i>	<i>Resultados</i>	
<i>Teor alcoólico (%v/v)</i>	12.5	12.5
<i>Acidez total (g/L)</i>	5.7	5.6
<i>Ph</i>	3,36	3,36
<i>Massa Volúmica (g/mL)</i>	0.9912	0.9914
<i>Extrato seco (g/L)</i>	24.2	24.8
<i>Açúcares redutores (g/L)</i>	4.9	4.9
<i>Turbidez (NTU's)</i>	0.83	0.75

Tabela 7: Caracterização sumária do vinho branco utilizado durante o estudo

<i>Parâmetros analisados</i>	<i>Resultados</i>	
<i>Teor alcoólico (%v/v)</i>	12.5	12.5
<i>Acidez total (g/L)</i>	5.6	5.6
<i>Ph</i>	3,35	3,36
<i>Massa Volúmica (g/mL)</i>	0.9904	0.9904
<i>Extrato seco (g/L)</i>	22.2	22.2
<i>Açúcares redutores (g/L)</i>	3.0	3.0

A acidez volátil é composta pelos ácidos pertencentes à série acética, podendo estes encontrarem-se no estado livre e em forma de sais (OIV, 2019) . A maior percentagem destes ácidos é ocupada pelo ácido acético, este por sua vez, no vinho, é originado durante as fermentações alcoólica e malolática (Instituto dos vinhos do Douro e Porto, 2018). Concentrações elevadas podem provocar efeitos organoléticos negativos, isto é, podem atribuir um carácter azedo ao vinho. Por este motivo a acidez volátil encontra-se regulamentada, não podendo exceder os 1,2 g/L salvo raras exceções de vinhos com regulamentação particular (OIV, 2015)

Nas amostras de vinho estudadas no presente trabalho não são observáveis diferenças significativas entre amostras do mesmo ensaio ($p > 0,05$). No ensaio comparativo entre velocidades de enchimento em vinho tinto (Figura 12a) para além de não se encontrarem diferenças significativas entre as amostras, também não se observam grandes variações de acidez volátil ao longo de cento e cinquenta dias. Neste ensaio as amostras, à exceção da amostra A, tiveram um pico de acidez volátil na primeira semana e nos meses seguintes os valores desta foram-se aproximando dos valores iniciais.

No segundo ensaio com vinho tinto (ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica), Figura 12b, também não são visíveis diferenças significativas entre amostras. Neste ensaio, registou-se um ligeiro aumento (0,02 g/L - amostra Tvt2; 0,04 g/L- amostra J; 0,03 g/L- amostra K) da acidez volátil nos primeiros trinta e um dias de estágio em garrafa. Após sessenta e nove dias, observou-se um segundo aumento dos valores nas amostras T e K.

Nas amostras de vinho rosé e branco (Figura 12c e 12d, respetivamente) observou-se um comportamento semelhante em ambas até aos setenta e quatro e setenta e cinco dias, respetivamente. Em nenhum destes dois tipos de vinho se observou diferenças significativas entre amostras. Já após cento e cinco dias observou-se um declínio da acidez volátil nas amostras de vinho rosé, já nas amostras de vinho branco, após cento e quatro dias, a acidez volátil manteve-se constante. As grandes variações da acidez volátil

possivelmente dever-se-ão a erros de análise. A acidez volátil tende a manter-se estável caso o vinho não se encontre contaminado com microrganismos de alteração.

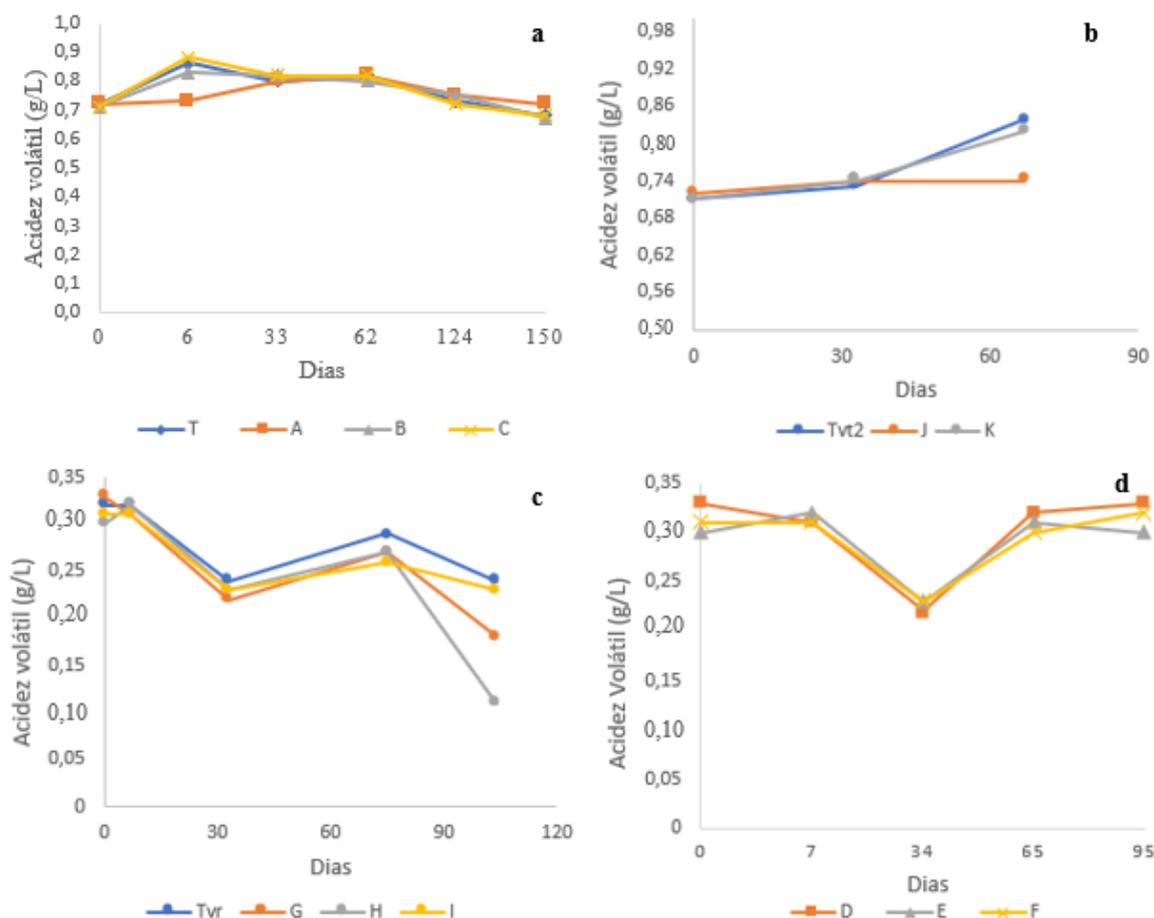


Figura 12: Quantificação da acidez volátil, das amostras de vinho tinto, envolvidas no estudo comparativo entre diferentes velocidades de enchimento (a) e das amostras envolvidas no estudo comparativo entre técnicas de estabilização microbiológica (b), rosé (c) e de vinho branco (d).

Quanto ao teor em dióxido de enxofre total e assumindo a possibilidade de desvio de até 5ppms, na maioria das análises realizadas não foram detetadas alterações significativas ao longo do tempo ($p > 0,05$). Contudo é observável uma ligeira diminuição dos seus valores ao longo do tempo, o que se encontra de acordo com Jackson, (2008); Puech *et al.*, (2006). As amostras que mais demonstram esta diminuição são as amostras testemunha dos ensaios em vinho tinto, onde se avaliaram as velocidades de enchimento, e em vinho rosé. A diminuição do SO_2T durante o período após o engarrafamento é normal. A formação de hidroxí-sulfonatos, redução das diquinonas (principalmente em vinhos tintos), oxidação da forma sulfito e claro, embora em pequenas quantidades, a perda por

evaporação através da rolha são os motivos pelos quais o SO_2T diminui ao longo do tempo (Jackson, 2008). No que diz respeito às amostras T e T_{VT} possuem uma diminuição superior às restantes amostras dos respetivos ensaios, esta pode ser explicada possivelmente pelo método de engarrafamento. O engarrafamento destas amostras foi manual o que acaba por expor as amostras a níveis de oxigenação superior.

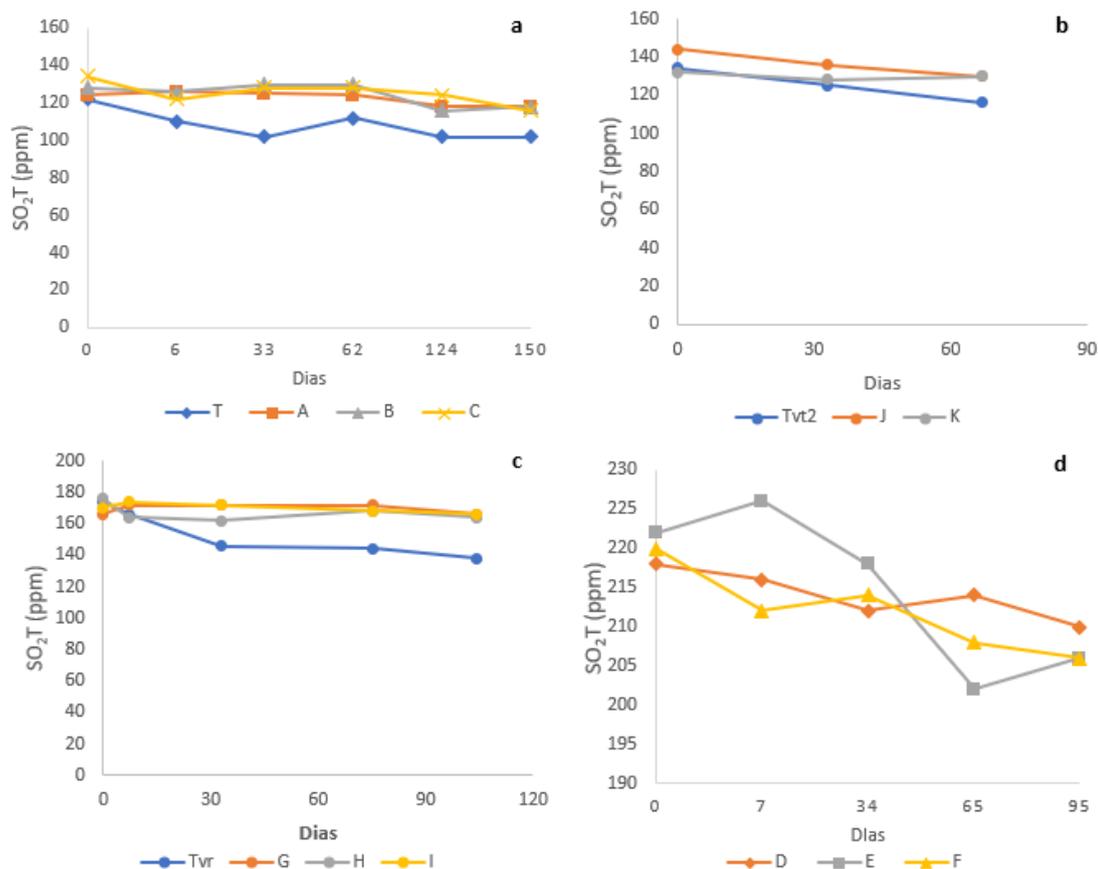


Figura 13: Quantificação do teor em anidrido sulfuroso total, em partes por milhão (ppm), das amostras de vinho tinto, envolvidas no estudo comparativo entre diferentes velocidades de enchimento (a) e das amostras envolvidas no estudo comparativo entre técnicas de estabilização microbiológica (b), das amostras de vinho rosé (c) e de vinho branco (d).

Através da análise da Figura 14 observamos um comportamento semelhante ao da Figura 13, isto é, registou-se uma diminuição gradual ao longo do estudo. Este fenómeno deve-se principalmente às suas reações com as quinonas, isto é, à redução das quinonas ou à formação de complexos incolores com quinonas (Boulton *et al.*, 1999). Neste parâmetro também se detetou uma diminuição superior nas amostras T e Tvr, sendo estas as amostras testemunhas do estudo comparativo entre velocidade de enchimento em vinho tinto e as

amostras do estudo comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé, contudo estas diferenças não chegam a ser significativas. Mais uma vez esta diferença poderá dever-se à sobre-oxigenação provocada durante o enchimento.

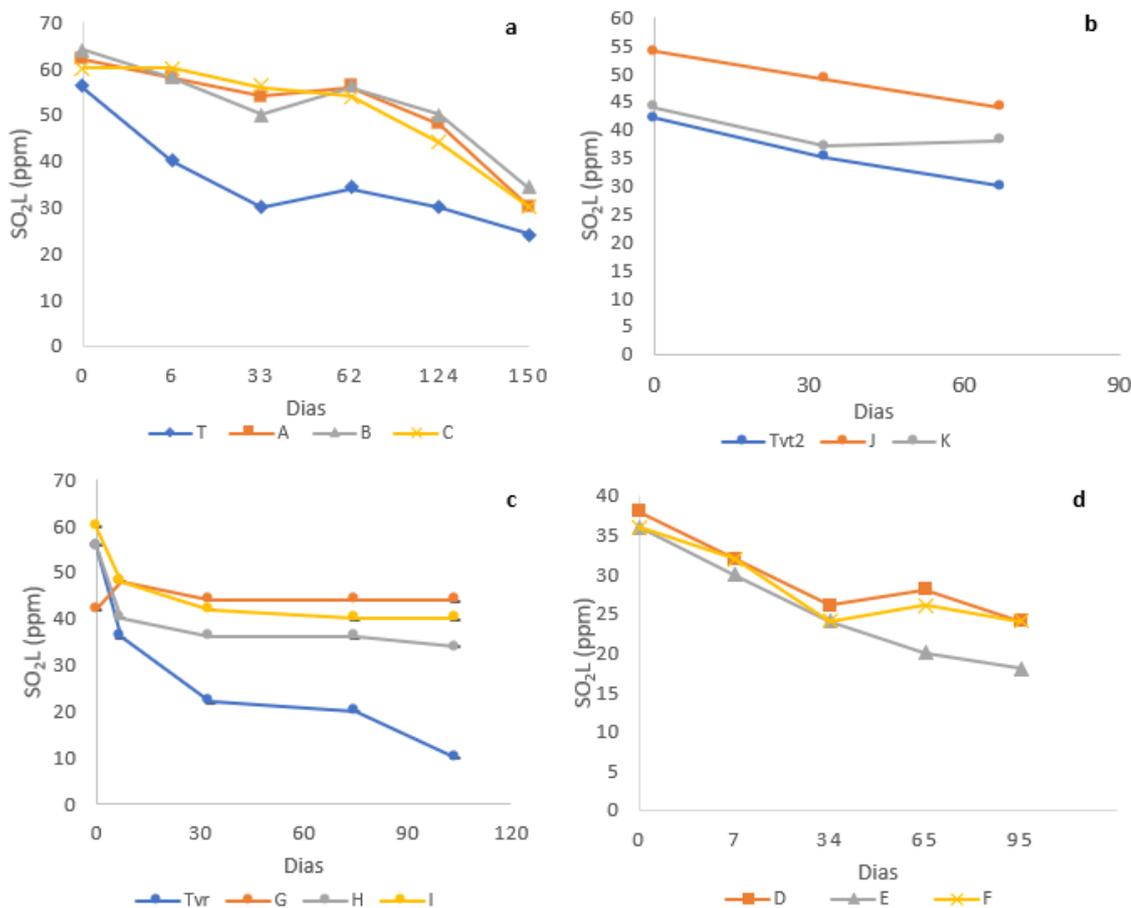


Figura 14: Quantificação do teor em anidrido sulfuroso livre, em partes por milhão (ppm), das amostras de vinho tinto, envolvidas no estudo comparativo entre diferentes velocidades de enchimento (a) e das amostras envolvidas no estudo comparativo entre técnicas de estabilização microbiológica (b), das amostras de vinho rosé (c) e de vinho branco (d).

4.2 Ensaio comparativo entre velocidades de enchimento, teste aplicado em vinho tinto

Neste ensaio recolheram-se amostras de quatro modalidades distintas. Atribuíram-se as denominações: amostra A, B, C e T que correspondem à velocidade de enchimento de 3500, 4000, 4500 garrafas/hora e amostra testemunha (amostra não pasteurizada), respetivamente. As temperaturas de pasteurização atingidas durante o processo de estabilização microbiológica pré-engarrafamento encontram-se na tabela 8.

Tabela 8: Temperatura atingida pelo vinho tinto em diferentes pontos, desde a pasteurização até ao enchimento.

		0	10	20	30	40	50	60
A	Visor do pasteurizador (°C)	86	85	86	85	86	86	85
	Saída do pasteurizador (°C)	53	51	50	49	48	50	47
	Visor do Depósito pulmão (°C)	49	49.3	48.5	49.2	50	49.5	48.7
	Saída do depósito pulmão (°C)	48	48	47	48	40	49	48
	Garrafa após enchimento (°C)	47	47	47	47	47	47	47
	B	Visor do pasteurizador (°C)	84	86	84	84	86	86
Saída do pasteurizador (°C)		47	47	45	44	44	45	47
Visor do depósito pulmão (°C)		46	46.8	46	46.5	46	47	46
Saída do depósito pulmão (°C)		45	44	45	45	45	45	45
Garrafa após enchimento (°C)		44	44	44	44	45	45	45
C		Visor do pasteurizador (°C)	82	82	87	86	84	82
	Saída do pasteurizador (°C)	43	43	45	44	43	43	44
	Visor do depósito pulmão (°C)	45	45	45	45	46	45	45
	Saída do depósito pulmão (°C)	44	44	44	45	45	44	45
	Garrafa após enchimento (°C)	43	44	44	44	44	44	44

Através da observação da tabela 8 é possível constatar a existência de ligeiras variações de temperatura, no mesmo ponto, em diferentes amostras. É ainda possível verificar que à medida que a velocidade de enchimento aumenta, existe uma tendência para que as temperaturas atingidas pelo vinho, desde a pasteurização até ao engarrafamento, diminuam.

4.2.1. Análise dos compostos fenólicos das amostras referentes ao ensaio comparativo entre velocidades de enchimento

Em seguida será apresentada a evolução do índice de fenóis totais, da intensidade da cor, da tonalidade, da pigmentação polimérica, do índice de polimerização, das antocianinas coradas e totais e dos pigmentos totais e do teor em taninos ao longo de cento e cinquenta dias. As Figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 permitem a comparação destes parâmetros entre as diferentes amostras utilizadas neste ensaio.

Os índices de fenóis totais encontram-se expressos em unidades de absorvância. Através da Figura 15 observa-se um desenvolvimento, deste parâmetro, muito semelhante entre as diferentes amostras, não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$). O que se observa, até aos cento e vinte e quatro dias, são períodos alternados de pequenos aumentos e declínios destes valores. Esta curva de evolução assemelha-se bastante à dos taninos, podendo ser um indício do motivo principal pelo qual se observaram estas variâncias. Já na última análise observou-se uma quebra desta tendência, isto é, registou-se uma continuação do aumento observada no mês anterior.

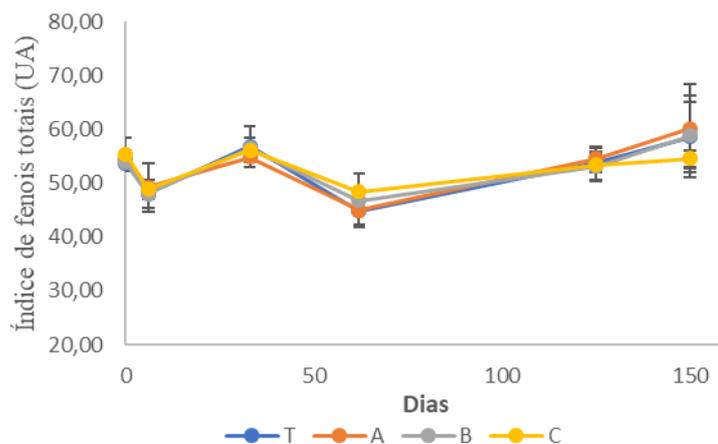


Figura 15: Quantificação do índice de fenóis totais ao longo de 5 meses de estágio em garrafa das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

Na intensidade de cor (Figura 16) das amostras nota-se uma ligeira diferença da amostra testemunha para as restantes, embora não seja uma diferença significativa ($p > 0,05$). No global é visível um decréscimo constante deste parâmetro. Vários estudos como o de Robinson *et al* (1966) indicam que a pasteurização tem um efeito negativo na intensidade de cor, embora neste estudo o mesmo não seja observável em quantidades significativas.

Puech *et al.*, (2006) num estudo onde avaliou a intensidade da cor de vinhos expostos a diferentes temperaturas de armazenamento durante 36 meses, também observou um decréscimo da intensidade nos primeiros 3 meses.

Na última análise já se observa um aumento da intensidade de cor nas amostras pasteurizadas, o que se encontra de acordo com o que Puech *et al.*, (2006) observou. Esta observação em conjugação com o aumento da tonalidade e do teor em pigmentos poliméricos verificado no mesmo período, poderá ser indicativo de que aumento da intensidade se deva a um aumento da tonalidade amarela, isto é, de um aumento da absorvância no comprimento de onda de 420 nm. Este aumento como já referido poderá dever-se ao aumento dos pigmentos poliméricos.

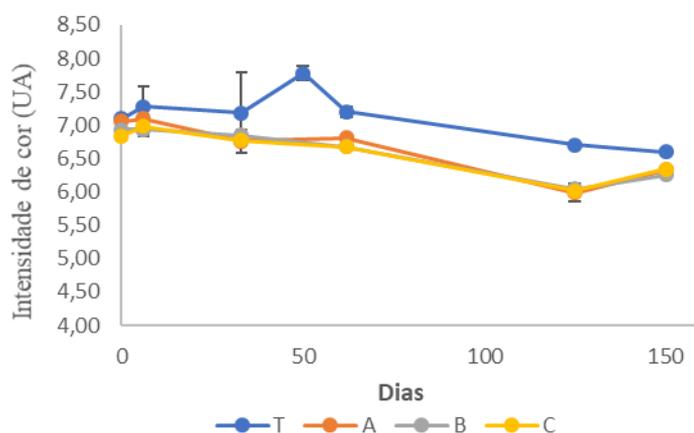


Figura 16: Quantificação da intensidade de cor, em unidades de absorvância, das amostras de vinho envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

Quanto à tonalidade (Figura 17), mais uma vez, observa-se um padrão muito similar entre as amostras, não existindo diferenças significativas entre estas ($p > 0,05$). Como a intensidade de cor, neste parâmetro observou-se uma pequena diminuição dos valores ao longo dos cento e vinte e quatro dias. Estes resultados vão contra a tendência observada por Puech *et al* (2006), o qual observou um aumento da tonalidade ao longo do tempo. Estes resultados contraditórios poderão dever-se à pequena extensão do estudo, visto que após os cento e vinte e quatro dias já se observou uma quebra da tendência, isto é, observou-se um ligeiro aumento da tonalidade.

O facto de a diminuição da tonalidade ser acompanhada por uma diminuição da intensidade de cor poderá significar que o decréscimo na intensidade de cor poderá não ser devido à polimerização das antocianinas. Em concordância com esta suposição estão os resultados obtidos para os pigmentos poliméricos e o índice de polimerização, no qual se observa o decréscimo destes valores.

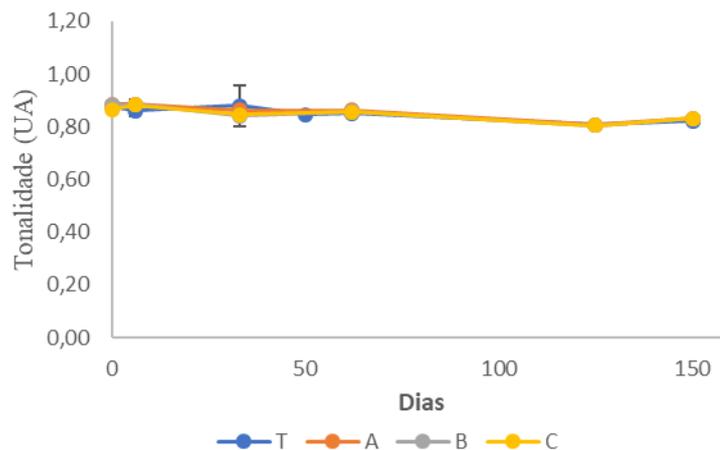


Figura 17: Quantificação da tonalidade, em unidades de absorvância, das amostras de vinho envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

Os pigmentos poliméricos (Figura 18) e o índice de polimerização (Figura 19) seguem uma tendência semelhante ao longo do estudo. Ao fim de cento e vinte e quatro dias, tanto o teor em pigmentos poliméricos como o índice de polimerização possuem valores inferiores aos iniciais, contudo não são muito diferentes. Embora neste período já se observe um pequeno aumento do índice de polimerização nas amostras C e T. Em nenhum dos casos se observou haver efeito significativo da velocidade de enchimento, isto é, não se registaram diferenças significativas entre amostras.

Segundo Revilla e González-Sanjosé (2001) existe evidência do aumento dos pigmentos poliméricos ao longo do tempo, embora o tempo de estágio em garrafa tenha sido superior ao presente estudo. Estes resultados acabam por suportar o facto da intensidade da cor e a tonalidade diminuírem, quando o que se observa noutros estudos é o aumento da tonalidade à medida que a intensidade da cor diminui.

Quagliari *et al* (2017) também obteve evoluções negativas do índice de polimerização enquanto observou decréscimos no teor de antocianinas.

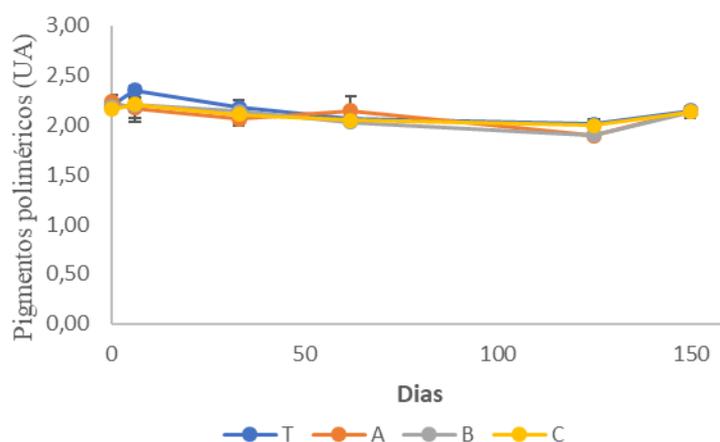


Figura 18: Quantificação dos pigmentos poliméricos, em unidades de absorvância, das amostras de vinho envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

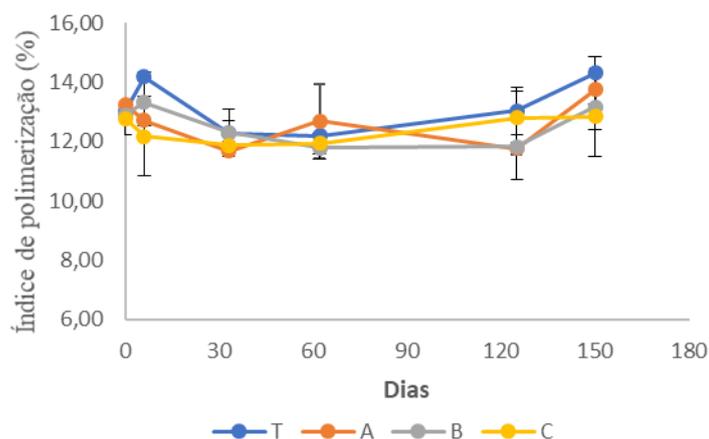


Figura 19: Índice de polimerização das amostras de vinho envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

A quantidade de antocianinas coradas (Figura 20a) presentes nas amostras está representada em unidades de absorvância. Nas amostras A, B e C registou-se um comportamento muito semelhante entre elas, sendo este de alterações mínimas no teor em antocianinas coradas. Já na amostra T é visível uma divergência de valores em relação às restantes amostras a partir do dia trinta e três. Contudo esta variação não chega a ser

estatisticamente significativa. Burin *et al* (2011) observou uma diminuição deste parâmetro ao longo do tempo, o que até ao momento não se verificou neste estudo, embora que nos últimos dois meses se observe uma leve regressão do teor em antocianinas coradas.

A Figura 20b permite constatar um comportamento muito semelhante entre as amostras no que toca à evolução do teor em antocianinas totais. Até ao dia trinta e três é visível uma tendência para valores entre as 15,2 e 15,6 unidades arbitrárias. Nos dias seguintes observou-se uma diminuição constante dos valores registados. (Monagas *et al.*, 2006) observou um decréscimo superior no teor das antocianinas totais durante o primeiro ano de envelhecimento. Já (Ribéreau-Gayon, 1982) observou uma perda de 50% das antocianinas totais entre o primeiro ano de envelhecimento em garrafa devido à sua condensação com taninos, fenómenos de degradação e transformação.

Em termos da totalidade dos pigmentos (Figura 20c) existentes nas amostras, é visível uma semelhança entre todas. É também observável uma variação muito pequena deste parâmetro ao longo do estudo, em que a tendência é para a diminuição destes valores.

A observação da Figura 20 em conjunto com o gráfico da evolução do índice de polimerização (Figura 19) permite supor que este decréscimo não se deve a reações de condensação e polimerização. Em vez disso, poderá dever-se à degradação das antocianinas ou formação de novos pigmentos principalmente através da condensação direta e por pontes de etil entre antocianinas e flavanois. A estabilidade das antocianinas e dos pigmentos totais observada nos primeiros meses poderá dever-se à ação do SO₂, o qual nestes primeiros meses ainda é significativo. Poderá ser este o motivo pelo qual não se observam os mesmos resultados obtidos em estudos mais longos, uma vez que o anidrido sulfuroso tem tendência a diminuir com o tempo e o seu efeito protetor também.

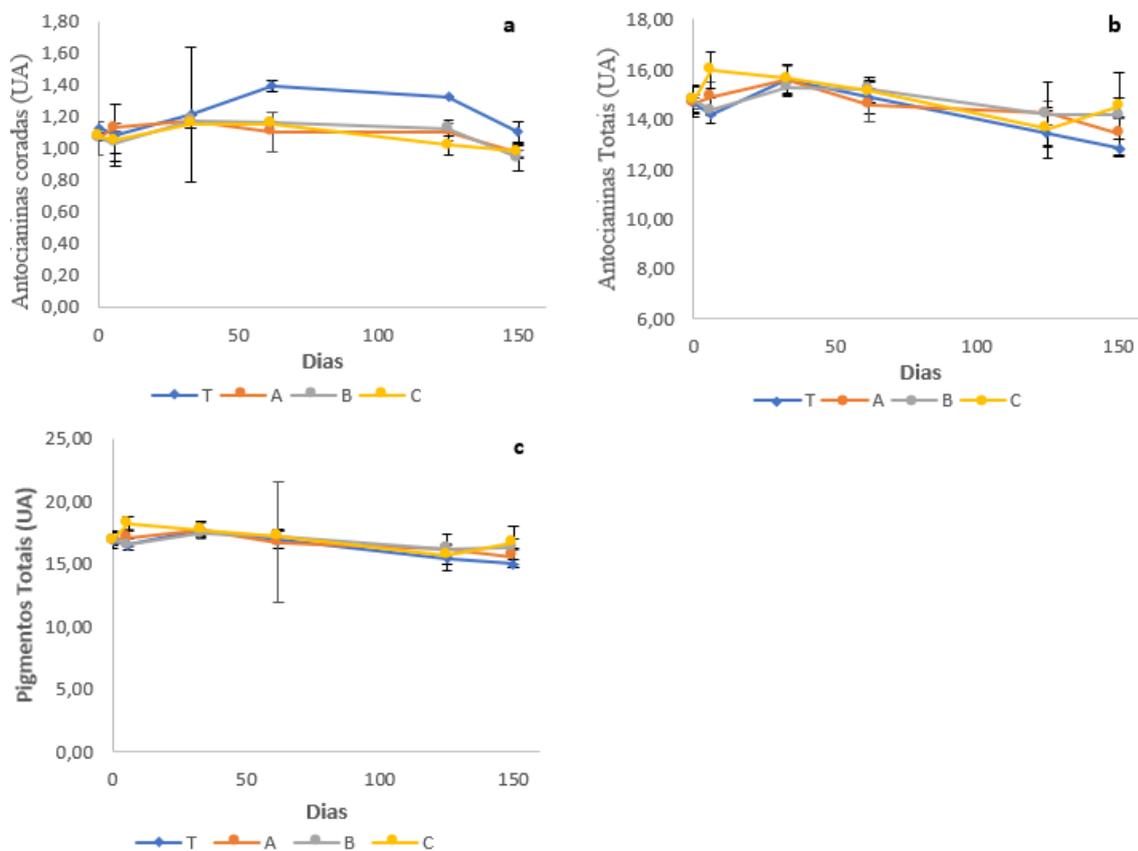


Figura 20: Quantificação do teor de antocianinas totais (a), de antocianinas coradas (b) e pigmentos totais (C), em unidades de absorvância, das amostras de vinho envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

O teor de taninos (Figura 21) encontra-se expresso em mg/L equivalentes de epicatequina. Nesta figura é observável uma variação do teor ao longo dos dias, no qual se observam diminuições e aumentos alternados dos valores. Na literatura (Revilla e González-Sanjosé, 2001), observaram uma diminuição deste parâmetro ao longo do tempo, à medida que os taninos se vão condensando e polimerizando o que provoca a sua precipitação. Já os aumentos poderão dever-se a quebras da ligação C-C nos polímeros, catalisada pelo meio ácido (Edwin, 1980; Fulcrand *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2007).

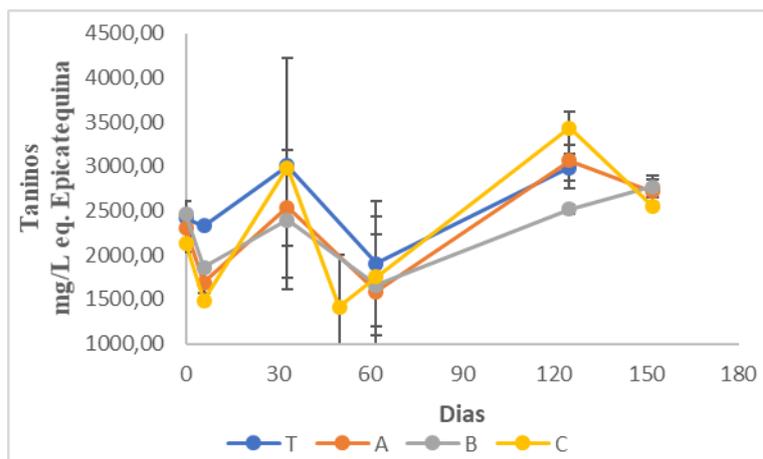


Figura 21: Quantificação de taninos, em mg/L equivalentes de Epicatequina das amostras de vinho de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

4.2.2 Análise da cor das amostras referentes ao ensaio comparativo entre velocidades de enchimento

A cor das amostras foi analisada de modo a averiguar possíveis alterações visualmente perceptíveis, recorrendo ao uso do CIELab. Através dos parâmetros obtidos segundo esta técnica, é possível detetar tais alterações, estas denominadas de diferença colorimétrica e representadas por ΔE . Os resultados obtidos são observáveis na Tabela 9.

Tabela 9: Diferenças colorimétricas, entre amostras de vinho tinto, obtidas pela técnica de CIELab. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

ΔE	Dias	T	A	B	C
T	0	0	0.47	1	0.76
	6	0	1.66	0.53	0.39
	33	0	2.09	1.54	1.77
	62	0	1.67	3.10	3.72
	125	0	4.25	4.30	4.56
	150	0	2.37	2.75	2.49
A	0	0.47	0	0.56	0.33
	6	1.66	0	1.14	1.32
	33	2.09	0	1.37	0.62
	62	1.67	0	1.46	2.09
	125	4.25	0	0.07	0.32
	150	2.37	0	0.42	0.12
B	0	1.00	0.56	0	0.24
	6	0.53	1.14	0	0.19
	33	1.54	1.37	0	0.76
	62	3.10	1.46	0	0.64
	125	4.30	0.07	0	0.26
	150	2.75	0.42	0	0.30
C	0	0.76	0.33	0.24	0
	6	0.39	1.32	0.19	0
	33	1.77	0.62	0.76	0
	62	3.72	2.09	0.64	0
	125	4.56	0.32	0.26	0
	150	2.49	0.12	0.30	0

Através de uma análise à tabela 9 podemos observar que apenas existem alterações colorimétricas perceptíveis ao olho entre as amostras T e A, T e B e T e C. Ou seja, apenas se observam diferenças colorimétricas significativas ($\Delta E > 3$) entre as amostras que sofreram pasteurização e a amostra testemunha. É ainda perceptível que estas diferenças foram atingidas mais rapidamente entre as amostras T-B e T-C, uma vez que já eram significativas ao fim de 62 dias enquanto que a diferença entre T e A só se observou ser significativa ao fim de 125 dias. Na análise realizada em maio observou-se uma regressão

das diferenças colorimétricas entre as amostras pasteurizadas e a amostra testemunha, ao ponto destas diferenças deixarem de ser significativas.

4.2.3 Análise microbiológica das amostras referentes ao ensaio comparativo entre velocidades de enchimento

Tabela 10: Resultados das análises microbiológicas obtidas para vinhos tintos, no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

<i>Amostra</i>	<i>Dias</i>	<i>Bolores e Leveduras</i>		<i>Bactérias</i>		<i>Brettanomyces</i>	
<i>T</i>	0	incontável	incontável	0	0	0	0
	6	incontável	incontável	0	0	0	0
	33	incontável	incontável	0	0	0	0
	61	3	2	0	0	0	0
	94	incontável	incontável	0	0	0	0
	130	incontável	incontável	6	0	0	0
<i>A</i>	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	33	0	0	0	0	0	0
	61	0	0	0	0	0	0
	94	0	0	0	0	0	0
	130	0	0	0	0	0	0
<i>B</i>	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	33	0	0	0	0	0	0
	61	0	0	0	0	0	0
	94	0	0	0	0	0	0
	130	0	0	0	0	0	0
<i>C</i>	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	33	0	0	0	0	0	0
	61	0	0	0	0	0	0
	94	0	0	0	0	0	0
	130	0	0	0	0	0	0

Na Tabela 10 podemos observar o número de colónias, de diferentes microorganismos, registados, em duplicado, ao longo do estudo. Através da sua análise é visível que apenas existem contaminações de bolores e leveduras nas amostras testemunha.

Nas restantes amostras não são observadas quaisquer contaminações. Isto permite inferir que a velocidade de enchimento e, por isso, a temperatura do vinho atingida durante a pasteurização não influencia a eficiência da estabilidade microbiológica. Nas amostras T, mais concretamente na última análise observaram-se seis colónias de bactérias. Estas provavelmente devem-se a contaminação cruzada por parte do analista, uma vez que é um caso isolado.

4.2.4. Análise sensorial das amostras referentes ao ensaio comparativo entre velocidades de enchimento

Os parâmetros organoléuticos dos vinhos representativos das amostras envolvidas no estudo da velocidade de enchimento foram avaliados em dois momentos diferentes. Em ambas as análises, os vinhos foram qualificados quanto à cor, ao aroma e ao sabor por um painel de cinco provadores. Os resultados médios das duas provas encontram-se representados nas Figuras 22 e 23.

A primeira análise realizou-se quinze dias após a recolha das amostras (Figura 22). No que toca à cor, a amostra testemunha destacou-se das restantes apresentando uma intensidade de cor e uma tonalidade violeta superior às restantes. Esta amostra obteve ainda uma pontuação um pouco superior na tonalidade vermelha. Nos restantes parâmetros avaliados, esta amostra não demonstrou possuir diferenças em relação às restantes. As amostras pasteurizadas, ou seja, as amostras A, B e C revelaram ser muito semelhantes entre si pois foram-lhes atribuídas pontuações muito semelhantes, o que é indicativo de que numa instância inicial a velocidade de enchimento não influencia a cor. Quanto ao aroma, não se verificou grandes diferenças entre amostras. Em todas destacaram-se o aroma frutado e balsâmico, o equilíbrio entre os aromas e a intensidade dos mesmos. No sabor também não se detetaram diferenças organoléuticas perceptíveis entre as amostras.

Nesta análise inicial é visível que, de um modo geral, não se detetaram diferenças significativas entre amostras ($p > 0,05$), o que poderá ser indicador de que a velocidade de enchimento e as variações de temperatura de pasteurização consequentes não afetam as características organoléuticas, pelo menos não de forma perceptível. Quanto às variações da intensidade de cor da amostra T em relação às restantes, este resultado está de

acordo com o que foi descrito por (Robinson *et al.*, 1966), os quais observaram uma redução da intensidade da cor em vinhos pasteurizados. Este fenómeno também foi observado durante as análises físico-químicas realizadas neste estudo. Embora a intensidade obtida por este meio tenha sido observada uma semana antes da análise sensorial, já se notava uma ligeira diferença, como é visível na Figura 16.

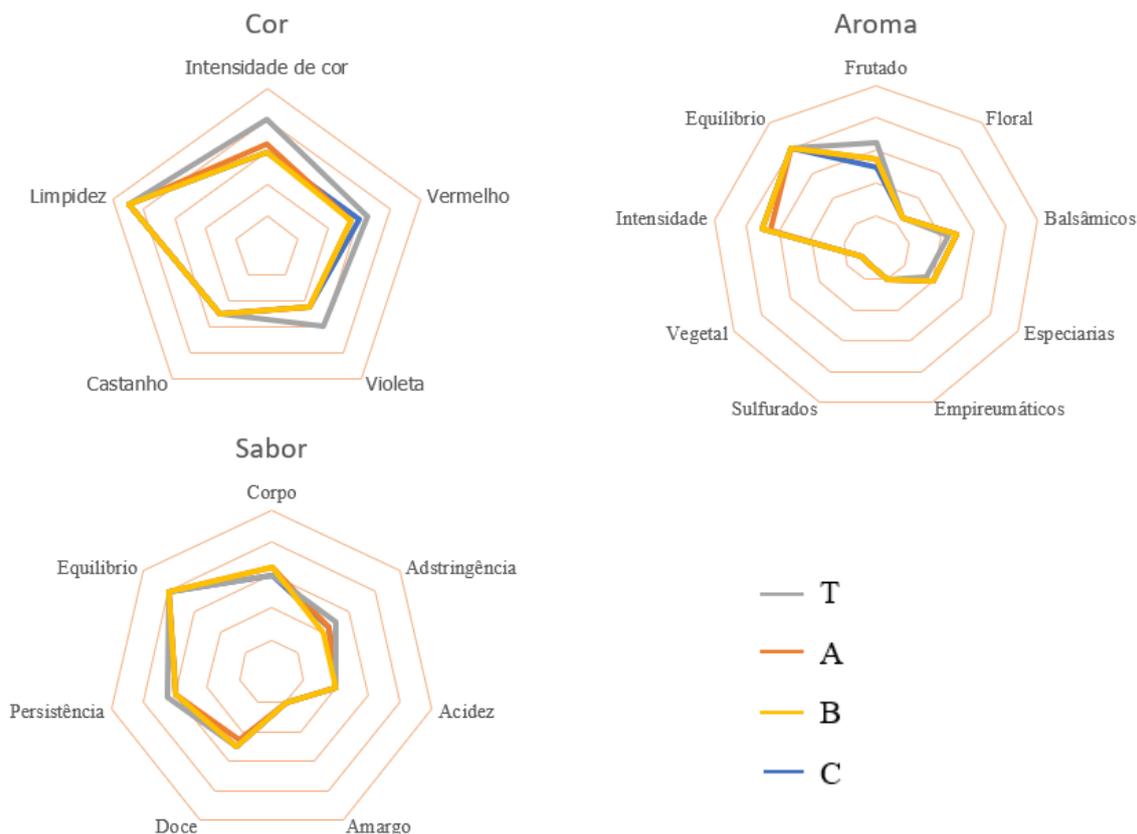


Figura 22: Pontuações médias da primeira análise sensorial para as amostras de vinho tinto, no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

A segunda análise (Figura 23) foi realizada no segundo mês após a recolha das amostras. Nesta análise organolética já são visíveis mais variações nas pontuações de vários parâmetros entre amostras, contudo não chegam a ser estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Em termos de cor a principal discrepância de pontuações entre amostras é referente à tonalidade violeta. Neste parâmetro é observável que a amostra A foi a que obteve uma pontuação superior, seguida da amostra C e depois a B. Já a T obteve uma grande diminuição na pontuação entre análises.

Quanto ao aroma, é visível um aumento do aroma floral e empireumático em todas as amostras, isto em relação à primeira análise. Observa-se ainda uma diminuição do equilíbrio dos aromas em todas as amostras à exceção da amostra testemunha. A amostra A demonstrou uma diferença de pontuações superior no aroma frutado. No que diz respeito ao aroma, não houve grandes variações entre análises. As principais variações foram com a amostra C, que obteve uma pontuação um pouco mais baixa no parâmetro da persistência e equilíbrio, e com a amostra A que obteve uma pontuação inferior no corpo e um superior na adstringência.

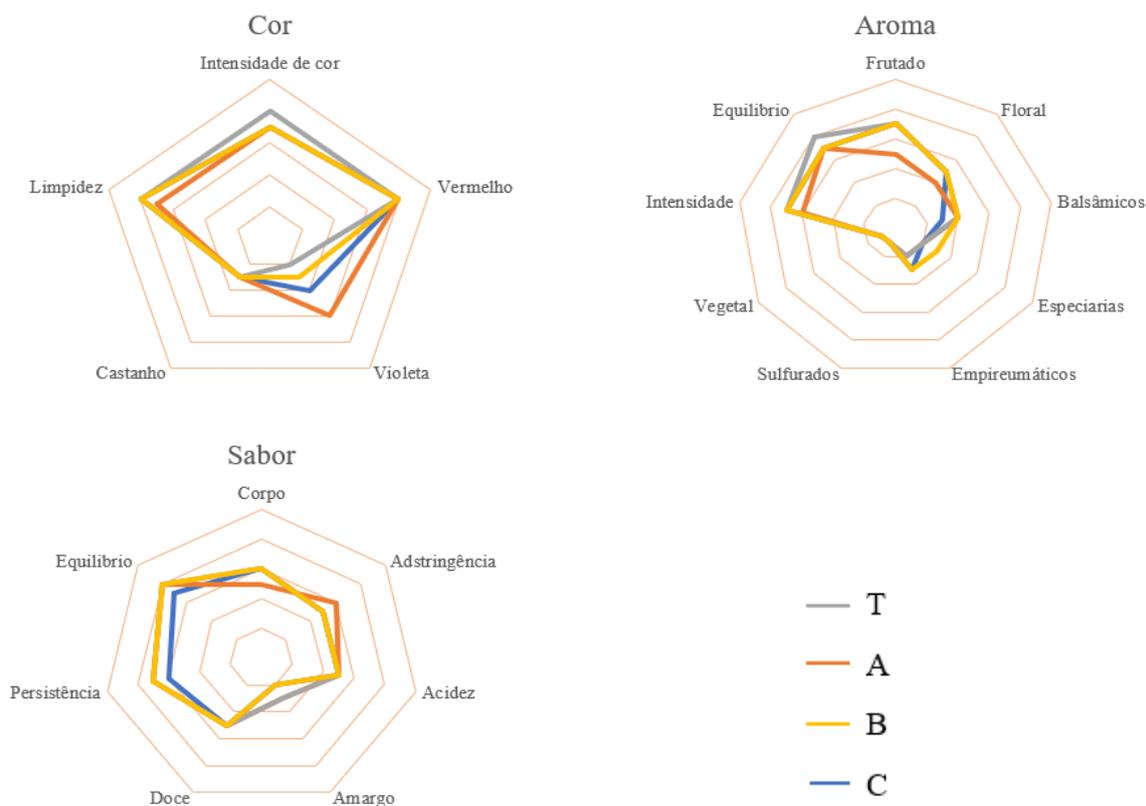


Figura 23: Pontuações médias da segunda análise sensorial para as amostras de vinho tinto, no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento. Amostra T (amostra testemunha do ensaio comparativo entre velocidades de enchimento), amostra A (velocidade de enchimento de 3500 garrafas/hora), amostra B (velocidade de enchimento de 4000 garrafas/hora), amostra C (velocidade de enchimento de 4500 garrafas/hora).

A partir da análise conjunta dos resultados físico-químicos, microbiológicos e sensoriais obtidos durante o estudo pode-se concluir que a velocidade de enchimento não afeta de forma significativamente as características qualitativas do vinho nem a estabilização microbiológica é posta em causa. Deste modo pode-se também concluir que,

para vinhos tintos, a quantidade produzida por hora pode ser maximizada, não afetando a qualidade do produto final.

4.3 Ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto.

Neste ensaio recolheram-se amostras de vinho tinto após diferentes tratamentos de estabilização microbiológica pré-engarrafamento, mais concretamente amostras que sofreram filtração ou pasteurização. Durante o ensaio de recolha das amostras, dez minutos antes e logo após a recolha, foram medidas as temperaturas do vinho em diferentes pontos do processo. As temperaturas registadas encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11: Temperaturas de exposição do vinho, desde o processo de pasteurização até ao seu engarrafamento, durante a recolha das amostras de vinho tinto

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Visor do pasteurizador (°C)</i>	<i>Saída do pasteurizador (°C)</i>	<i>Visor do depósito pulmão (°C)</i>	<i>Saída do depósito pulmão (°C)</i>	<i>Saída do depósito pulmão (°C)</i>
<i>0</i>	90	43	48,3	46	47
<i>10</i>	88	43	48,5	46	47

4.3.1. Análise dos compostos fenólicos das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto.

Em seguida serão expostas, em formato de gráfico, as evoluções de diferentes parâmetros relacionados com os compostos fenólicos em amostras de vinho tinto. Nas Figuras 24 à 31 conseguimos observar os resultados obtidos após o engarrafamento.

Os índices de fenóis totais no ensaio em vinho tinto (Figura 24) mantiveram-se mais ou menos constantes, em todas as amostras, durante os sessenta e nove dias. Apenas a amostra K (filtrada) demonstrou uma ligeira subida na última análise, contudo não se observou ser significativa ($p > 0,05$).

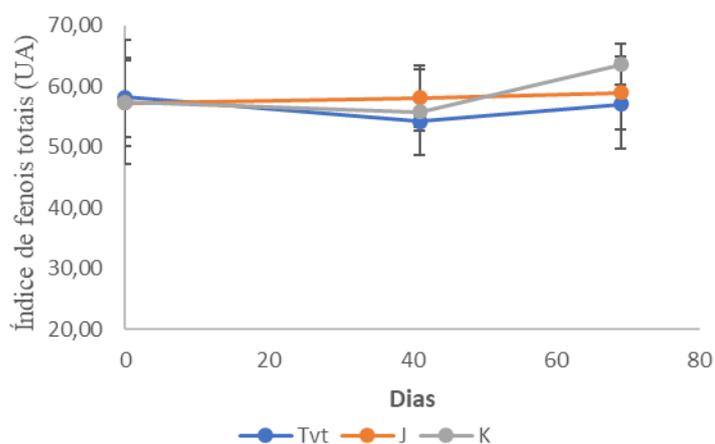


Figura 24: Quantificação do índice de fenóis totais, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).

Na Figura 25, é possível observar um ligeiro declínio da intensidade de cor, nas amostras T e K, após quarenta e um dias de engarrafamento. Após sessenta e nove observou-se o contrário, isto é, tanto T como K tiveram um aumento da intensidade de cor, contudo não foi o suficiente para atingir os valores registados na segunda análise. Como já referido nos resultados do ensaio anterior, Puech *et al* (2006) registou um comportamento semelhante nos primeiros três meses do periodo de envelhecimento em garrafa.

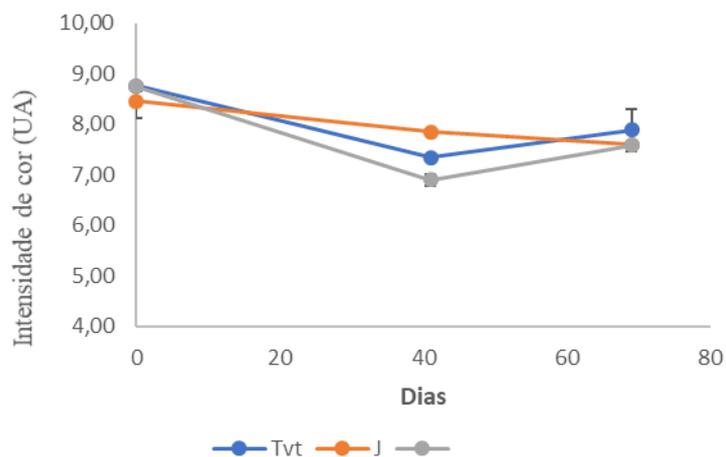


Figura 25: Quantificação da intensidade de cor, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).

Quanto ao Figura 26 observou-se um distanciamento entre a tonalidade das amostras T e K e das amostras J nos primeiros quarenta e um dias. Contudo após esse período já se observaram valores mais próximos entre amostras. Estas diferenças não são estatisticamente significativas. As alterações não parecem estar relacionadas com a degradação/polimerizaçãodas antocianinas. Ao invés disso a tonalidade demonstra seguir o mesmo padrão que os pigmentos poliméricos. Deste modo a diminuição da tonalidade poderá dever-se a reações de quebra de ligações entre os compostos poliméricos ou então devido à sua precipitação. Os pigmentos poliméricos estão associados a picos de absorvância nos 420 nm o que explicaria a diminuição no primeiro mês. Já o aumento da tonalidade no segundo mês poderá ser explicado por fenómenos de polimerização que conferem tons mais amarelados e com isso aumentem a absorvância nos 420 nm.

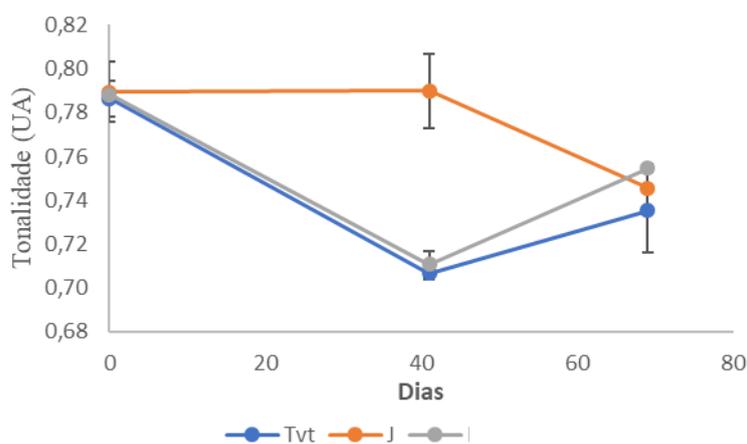


Figura 26: Quantificação da tonalidade, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).

Nas Figuras 27a e 27b, onde se encontram os resultados do índice de polimerização e o teor em pigmentos poliméricos, não se registaram diferenças significativas entre as amostras ($p > 0,05$). Para além disto, não se observaram grandes variações ao longo dos sessenta e nove dias, no índice de polimerização nem no teor em pigmentos poliméricos. Observou-se apenas um pequeno declínio das amostras T e K nos primeiros 41 dias, seguido de um aumento para valores semelhantes aos iniciais. Estes fenómenos poderão ser explicados pela precipitação dos pigmentos, o que explica a diminuição dos valores, já

o aumento poderá dever-se ao mecanismos de condensação e polimerização dos pigmentos poliméricos. A estabilidade relativa observada, poderá dever-se ao pequeno período de estágio em garrafa estudado.

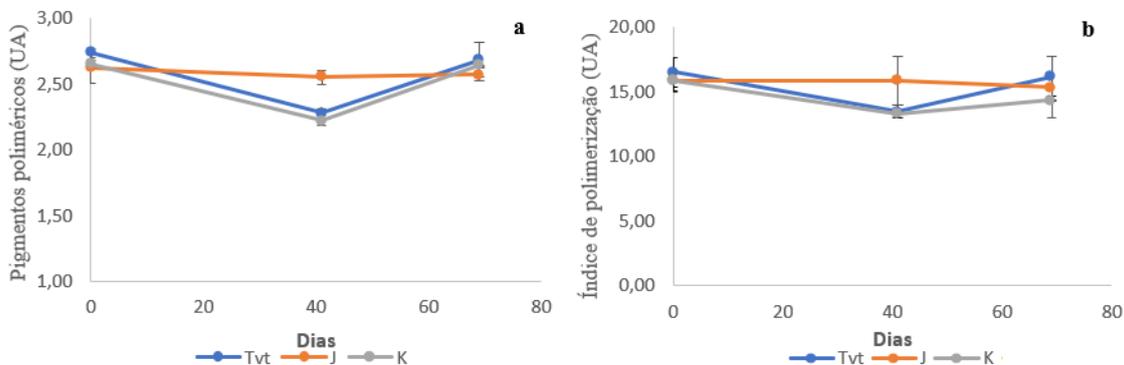


Figura 27: Quantificação dos pigmentos poliméricos e índice de polimerização das amostras de vinho tinto (a e b, respetivamente) envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).

Na Figura 28 observa-se uma tendência para a diminuição das antocianinas coradas, contudo as diferenças entre amostras não são estatisticamente significativas. A diminuição das antocianinas coradas poderá dever-se tanto à descoloração destas por parte do anidrido sulfuroso ou devido à polimerização e condensação destas, visto que se observam variações na quantificação dos pigmentos poliméricos.

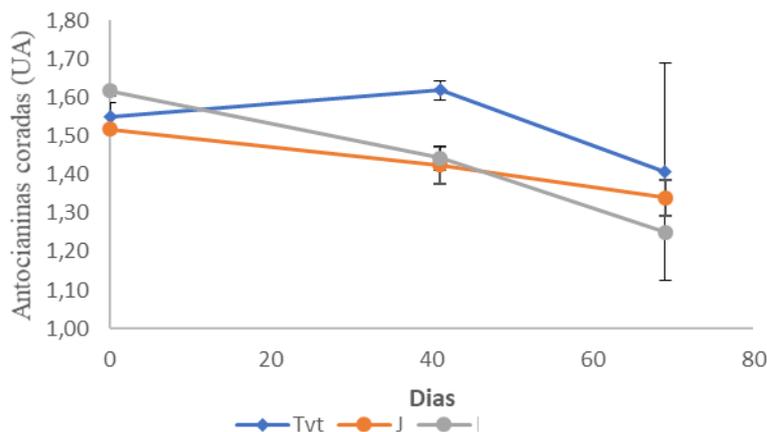


Figura 28: Quantificação do teor em antocianinas coradas, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).

No teor de antocianinas totais, não são observáveis quer variações significativas entre as amostras, quer grandes variações ao longo dos sessenta e nove dias. Nos primeiros meses após o engarrafamento o teor em anidrido sulfuroso total permanece elevado e possivelmente ligado às antocianinas, protengendo-as de sofrerem fenómenos de degradação.

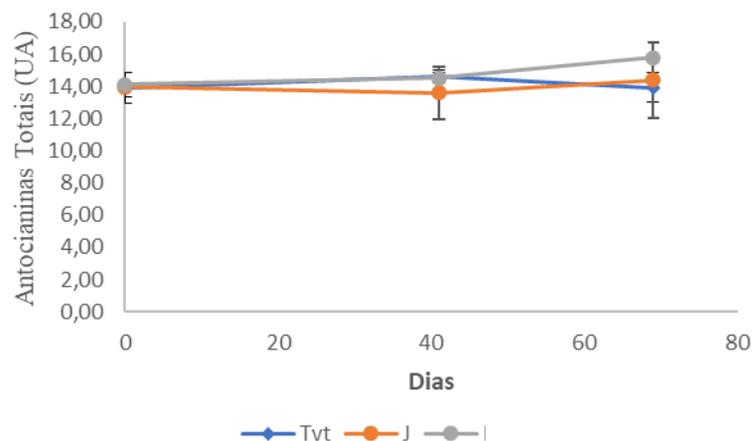


Figura 29: Quantificação do teor em antocianinas totais, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).

Na Figura 30 observamos, principalmente nas amostras J e K, uma constância dos valores. Já na amostra T observa-se um ligeiro aumento após sessenta e nove dias, o qual parece estar associado ao aumento das antocianinas totais no mesmo período. Contudo a diferença entre amostras não é significativa. Outra constatação curiosa obtida pela análise da Figura 30, e em comparação com a Figura 29, é o facto de que o número de unidades de absorvância em ambos os gráficos é semelhante. Isto é indicador de que nestes vinhos o principal pigmento presente são as antocianinas. Noutro estudo já mencionado acima Monagas *et al* (2006) foi observado uma diminuição das antocianinas totais. Contudo nesses ensaios foram aplicados tempos de estágio em garrafa superiores.

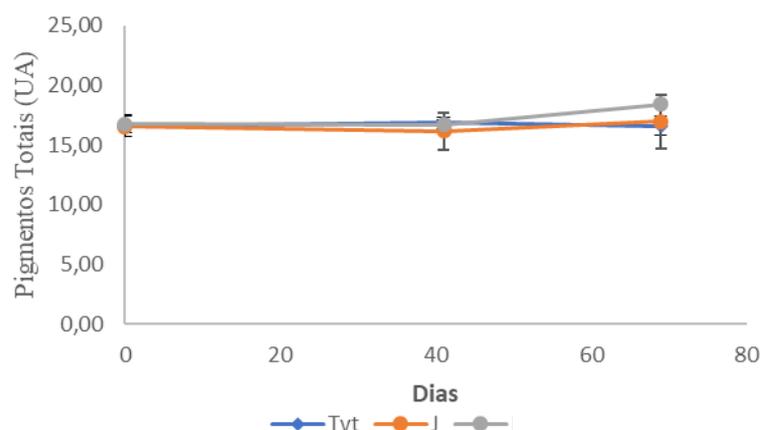


Figura 30: Quantificação do teor em pigmentos totais, em unidades de absorvância, das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).

Nos taninos (Figura 31) observa-se um grande decréscimo nos primeiros quarenta e um dias nas amostras J e K. Isto poderá dever-se à precipitação dos mesmos. Já na última análise observa-se um aumento, aproximando-se dos valores da amostra testemunha, que teve uma estabilidade superior no que diz respeito aos taninos. As amostras J e K, isto é, amostra pasteurizada e filtrada, aparentam um desenvolvimento contrário o observado por Revilla e González-Sanjose, (2001), o qual verificou um diminuição constante deste parâmetro ao longo do tempo. Contudo é necessário salientar a pequena duração do estudo. A polimerização direta dos taninos é um processo lento (Jackson, 2014) e o contraste entre a formação de taninos (quebra da ligação C-C nos polímeros) e o seu desaparecimento (formação de novos pigmentos e precipitação) (Edwin, 1980; Fulcrand *et al.*, 2006) poderá levar a estas variações.

A amostra K na análise realizada após quarenta e um dias do engarrafamento demonstrou um elevado desvio padrão, isto poderá dever-se a um erro de execução por parte do operador, o que poderá ter provocado uma leitura inferior à real numa das leituras obtidas na análise. Este caso teria sido retificado com uma nova análise, que não aconteceu devido à atual situação de saúde pública.

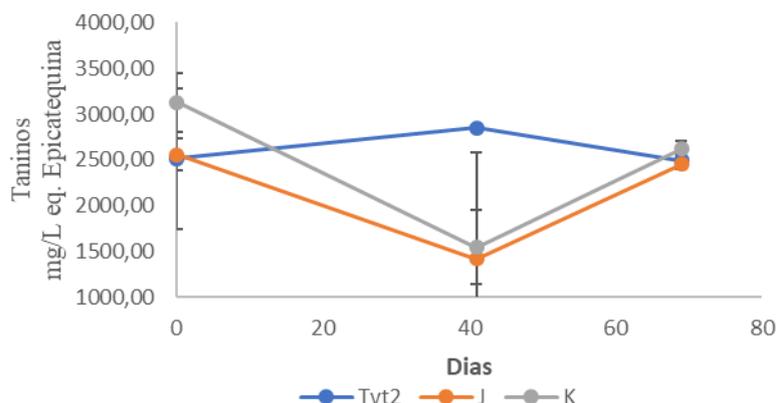


Figura 31: Quantificação de taninos, em mg/L equivalentes de Epicatequina das amostras de vinho de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).

4.3.2 Análise da cor das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto.

Os parâmetros do CIELab foram calculados, para todas as amostras de vinho utilizadas neste estudo, ao longo de sessenta e nove dias. De modo a averiguar a existência de alterações significativas nos parâmetros cromáticos calcularam-se as diferenças colorimétricas (ΔE) entre amostras de cada ensaio. Os resultados obtidos referentes a esta análise encontram-se na tabela 12.

Tabela 12: Diferenças colorimétricas, entre amostras de vinho tinto recolhidas aquando do ensaio comparativo entre técnicas de estabilização microbiológica, obtidas pela técnica de CIELab. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).

ΔE	Dias	Tvt2	J	K
Tvt2	0	0	3,6	1,2
	41	0	4,1	2,0
	69	0	2,3	2,3
J	0	3,6	0	4,8
	41	4,1	0	6,0
	69	2,3	0	0,10
K	0	1,2	4,8	0
	41	2,0	6,0	0
	69	2,3	0,10	0

No ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica (Tabela 12) já são visíveis diferenças significativas. A amostra que sofreu um tratamento de pasteurização demonstrou a existência de diferenças em relação à amostra K e à testemunha, logo na primeira análise. Já a amostra que sofreu filtração não apresenta ainda diferenças significativas em relação à amostra T. Após quarenta e um dias observou-se uma regressão nas diferenças colorimétricas entre as amostras T e J, deixando estas de ser significativas.

4.3.3. Análise microbiológica das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto

Tabela 13: Resultados das análises microbiológicas obtidas para vinhos tintos, no ensaio de comparação entre técnicas de estabilização microbiológica. Amostra Tvt2 (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho tinto), amostra J (amostra pasteurizada), amostra K (amostra filtrada).

<i>Amostra</i>	<i>Dias</i>	<i>Bolores e Leveduras</i>		<i>Bactérias</i>		<i>Brettanomyces</i>	
<i>Tvt2</i>	0	incontável	incontável	incontável	incontável	incontável	incontável
	44	incontável	incontável	incontável	incontável	incontável	incontável
	60	incontável	incontável	0	0	0	0
<i>J</i>	0	0	0	0	0	0	0
	44	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0
<i>K</i>	0	2	1	0	0	0	0
	44	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0

Através da análise da Tabela 13 é visível que as amostras sem qualquer tipo de estabilização microbiana pré-engarrafamento apresentam um número incontável de colónias de bolores e leveduras, de bactérias e de Brettanomyces, ao longo dos sessenta e nove dias. Nas amostras pasteurizadas não foram detetadas colónias ao longo de todo o estudo, já nas amostras que sofreram um tratamento de filtração observaram-se algumas colónias de bolores e leveduras na análise inicial, contudo nas análises seguintes não foi detetada a presença destes microrganismos.

A análise dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do ensaio comparativo entre a filtração e a pasteurização, como técnicas de estabilização microbiológica, permitiram concluir que tanto a eficácia a nível microbiológico bem como a qualidade do vinho não afetavam a qualidade do produto final. Neste ensaio não foi possível a realização de uma prova sensorial, contudo as provas sensoriais apenas poderiam comprovar sensorialmente diferenças encontradas nos parâmetros físico-químicos. Como não foram detetadas alterações significativas entre amostras a nível físico-químico pode-se concluir que a nível sensorial também não se encontrariam diferenças.

4.4 Ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica de vinho rosé

Neste ensaio recolheram-se amostras de vinho após diferentes tratamentos de estabilização microbiológica pré-engarrafamento. Recolheram-se amostras de vinho após pasteurização com enchimento a frio (Amostra G), amostras de vinho após pasteurização com enchimento a quente (H), amostras após filtração (Amostras I) e amostras sem qualquer tipo de estabilização (Amostras T_{VR}). Durante o ensaio de recolha das amostras, dez minutos antes e logo após a recolha, foram medidas as temperaturas do vinho em diferentes pontos do processo. As temperaturas registadas encontram-se na tabela 14.

Tabela 14: Temperaturas de exposição do vinho, desde o processo de pasteurização até ao seu engarrafamento, durante a recolha das amostras de vinho rosé.

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Vinho rosé (enchimento a frio)</i>		<i>Vinho rosé (enchimento a quente)</i>	
	0	10	0	10
<i>Visor do pasteurizador (°C)</i>	95	94	84	84
<i>T de saída do pasteurizador (°C)</i>	60	60	61	61
<i>Visor do BIB (°C)</i>	40.9	40.3	57.6	57.6
<i>T de saída do BIB (°C)</i>	42	41	52	51
<i>Garrafa após enchimento (°C)</i>	27	26	43	43

4.4.1. Análise dos compostos fenólicos das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé

Nos gráficos seguintes (Figura 32 à 37) encontram-se os resultados obtidos para os diferentes parâmetros dos compostos fenólicos avaliados.

Na Figura 32 vemos que, no que toca ao índice de fenóis totais, as amostras T e I têm valores muito semelhantes ao longo dos cento e quatro dias. É visível ainda que embora nos primeiros setenta e quatro dias, as amostras G e H apresentassem valores superiores, a tendência observada é de os valores de cada amostra se aproximarem, observando-se, até esse período um ligeiro declínio, em todas as amostras, em relação aos valores observados na primeira análise. Já na última análise observou-se um aumento em todas as amostras

Na Figura 32 é ainda possível observar a existência de diferenças entre as diferentes amostras, contudo não chegam a ser significativas ($p>0,05$). As amostras que sofreram pasteurização apresentaram valores superiores de fenóis totais em relação às amostras testemunha e filtradas, principalmente nos primeiros trinta e três dias de estágio em garrafa. Contudo é também visível uma maior estabilidade dos compostos fenólicos nas amostras T e I (amostras testemunhas e filtradas), não significando por isso que a pasteurização seja mais benéfica do que a filtração de vinhos rosé. Na última análise observou-se uma aproximação dos valores entre as amostras G e I. Além desta observação é ainda possível constatar um aumento do índice de fenóis totais em todas as amostras.

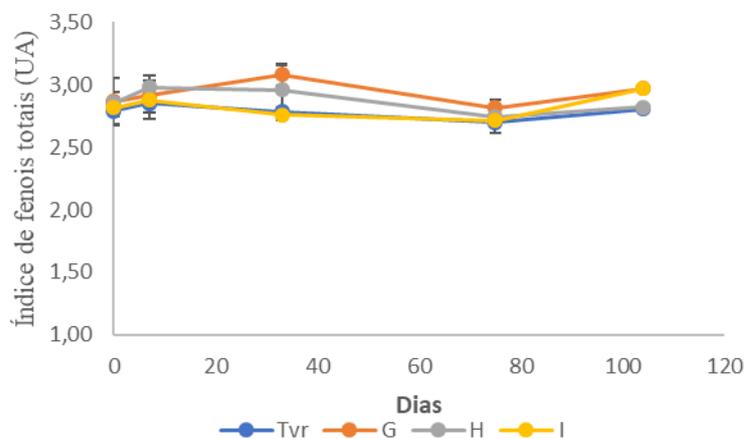


Figura 32: Quantificação do índice de fenóis totais, em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).

Na Figura 33, é perceptível uma evolução da intensidade de cor muito semelhante entre todas as amostras, não sendo observáveis diferenças significativas entre amostras. É visível um ligeiro aumento após a primeira semana seguida de uma aproximação dos

valores iniciais até aos setenta e quatro dias. Segundo Ribéreau-Gayon, (1982) nos vinhos com concentrações de taninos insuficientes, o que é o caso dos vinhos rosé, apenas algumas antocianinas combinam com taninos e como estas são instáveis acabam por se decompor e consequentemente reduzir a cor do vinho e alterar a tonalidade para tons de amarelo. Este fenómeno possivelmente explica os resultados obtidos na intensidade da cor e na tonalidade até ao segundo mês. Na última análise registou-se um aumento da intensidade em todas as amostras. Provavelmente dever-se-á ao aumento dos compostos poliméricos.

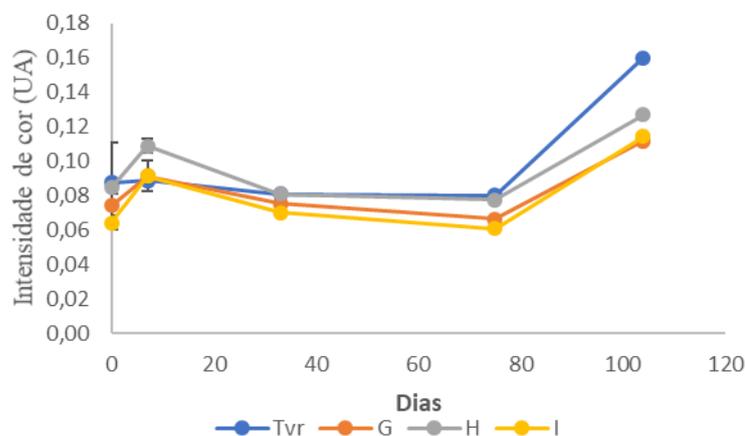


Figura 33: Quantificação da intensidade de cor, em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).

Quanto à tonalidade, na Figura 34, observa-se um declínio após a primeira semana. Estes valores mantêm-se durante os primeiros trinta e três dias, para G, H e I, e logo após registou-se um ligeiro aumento seguido de um decréscimo dos valores. Em geral, para estas amostras a tonalidade manteve-se estável. Quanto à amostra T, observou-se uma grande queda da tonalidade durante a primeira semana. Nos dias seguintes este comportamento continuou, contudo esta diferença de evolução das amostras T não se verificou ser significativa ($p > 0,05$) em relação às restantes amostras. Os valores menores da tonalidade nas das amostras T podem dever-se ao método de engarrafamento, visto que, devido a este, as amostras tiveram uma oxigenação superior, o que consequentemente poderá ter afetado a quantidade de anidrido sulfuroso livre e total (comprovado pelas

Figura 13c e 14c). A redução da quantidade de SO₂ limita a sua ação de descoloração das antocianinas coradas, libertando as mesmas. Isto poderá ainda explicar o motivo do aumento de antocianinas totais no terceiro mês nas amostras T.

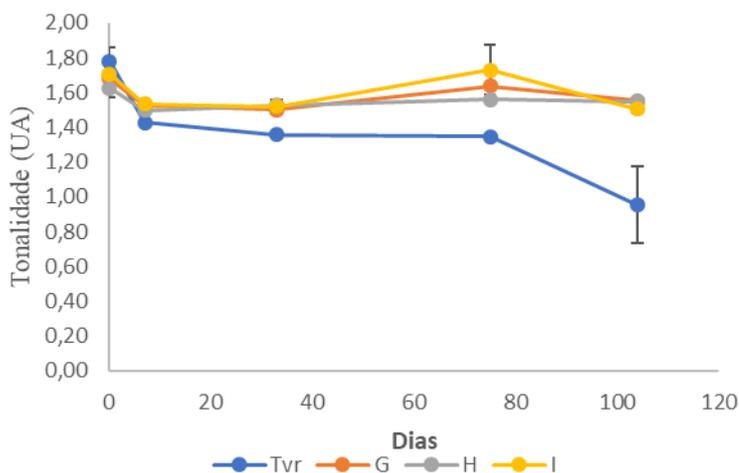


Figura 34: Quantificação da tonalidade, em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).

O índice de polimerização e os pigmentos poliméricos das amostras T, G, H e I (Figura 35a e 36b) sofreu um aumento na primeira semana. Contudo, nos dias seguintes registou-se um declínio seguido de uma estabilização dos valores, em todas as amostras, o que levou à aproximação do índice inicial. A inexistência de taninos propicia tanto o baixo número de pigmentos poliméricos existentes bem como a taxa de polimerização. Na última análise observou-se um aumento, tanto do teor de pigmentos poliméricos como do índice de polimerização. Numa visão global, não se observaram diferenças significativas, tanto para o índice de polimerização como para o teor de pigmentos poliméricos, entre as diferentes amostras.

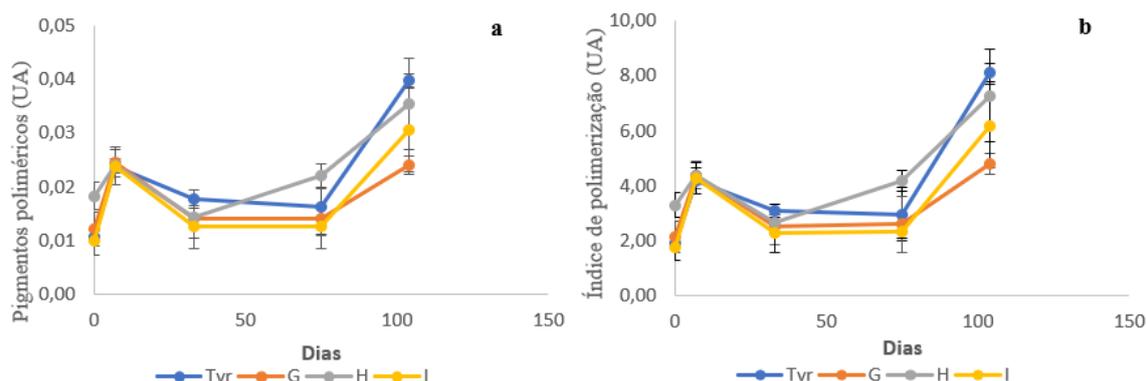


Figura 35: Quantificação dos pigmentos poliméricos e índice de polimerização, em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé (a e b), respetivamente, envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).

Através da observação da Figura 36a e 36b é perceptível uma variação alternada dos valores, observando-se aumentos seguidos de declínios, tanto das antocianinas totais como das antocianinas coradas, isto nos primeiros setenta e quatro dias. É ainda visível que o principal responsável pelo decréscimo das antocianinas totais são as antocianinas coradas. Estas representam uma percentagem das antocianinas totais e as proporções de decréscimo, observadas nas Figuras 36a e 36b são muito semelhantes, à exceção das amostras T nas quais, no dia setenta e quatro se registou um aumento do teor em antocianinas coradas e uma diminuição nas totais. Como referido acima, a falta de taninos provoca uma maior instabilidade nas antocianinas que acabam por degradar, o que pode explicar a tendência de redução das antocianinas totais observada na Figura 36b . Na última análise observou-se um aumento do teor em antocianinas coradas nas amostras T. Como referido em cima, este aumento poderá dever-se aos níveis menores de SO₂ registados para esta amostra. É ainda importante referir que não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras.

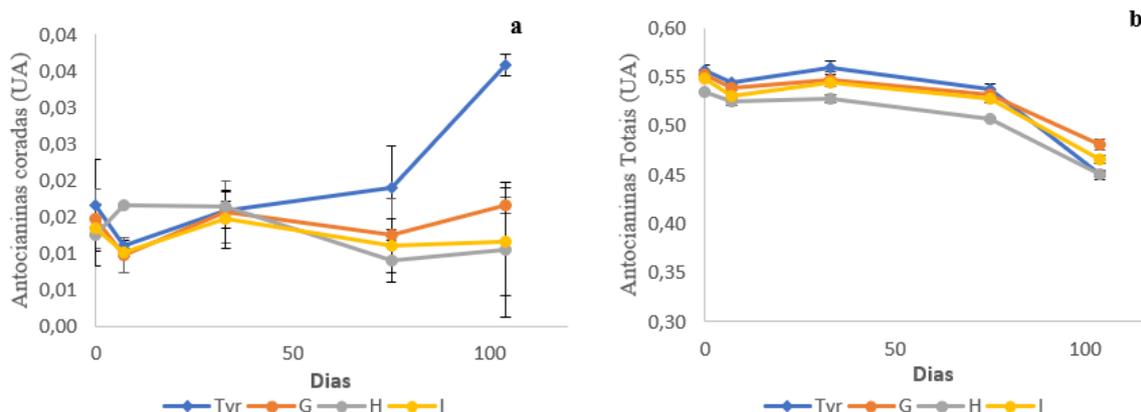


Figura 36: Quantificação do teor em antocianinas coradas e totais (a e b, respetivamente), em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).

Na Figura 37, este representado por unidades de absorvância, é visível uma tendência de diminuição dos pigmentos totais. Embora os valores difiram um pouco entre as amostras ($p > 0,05$), a tendência de evolução é muito semelhante em todas. Estes valores estão de acordo com (Ribéreau-Gayon, 1982) o qual afirma que a insuficiência de taninos provoca uma maior instabilidade nas antocianinas.

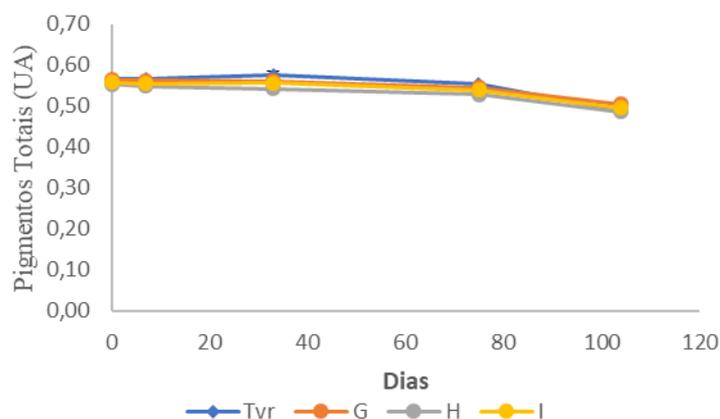


Figura 37: Quantificação do teor em pigmentos totais, em unidades de absorvância, das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).

4.4.2. Análise da cor das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé

Os parâmetros do CIELab foram calculados, para todas as amostras de vinho rosé utilizadas neste estudo, ao longo de cento e quatro dias. De modo a averiguar a existência de alterações significativas nos parâmetros cromáticos calcularam-se as diferenças colorimétricas (ΔE) entre amostras de cada ensaio. Os resultados obtidos referentes a esta análise encontram-se na tabela 15.

Tabela 15: Diferenças colorimétricas, entre amostras de vinho rosé, obtidas pela técnica de CIELab. Amostra TVR (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).

ΔE	Dias	TVR	G	H	I
TVR	0	0	0,43	0,86	0,17
	7	0	0,29	0,59	0,40
	33	0	0,55	0,57	0,66
	75	0	0,87	0,60	0,97
	104	0	3,16	2,82	3,05
G	0	0,43	0	0,44	0,38
	7	0,29	0	0,45	0,40
	33	0,55	0	0,16	0,16
	75	0,87	0	0,40	0,13
	104	3,16	0	0,53	0,14
H	0	0,86	0,44	0	0,80
	7	0,59	0,45	0	0,46
	33	0,57	0,16	0	0,29
	75	0,60	0,40	0	0,52
	104	2,82	0,53	0	0,44
I	0	0,17	0,38	0,80	0
	7	0,40	0,23	0,46	0
	33	0,66	0,16	0,29	0
	75	0,97	0,13	0,52	0
	104	3,05	0,14	0,44	0

No vinho rosé (Tabela 15) não são detetáveis quaisquer diferenças significativas ($\Delta E < 3$), entre amostras, nos primeiros setenta e cinco dias. O que indica que até este período nenhuma técnica de estabilização microbiológica provoca alterações colorimétricas visualmente perceptíveis. Contudo é visível um aumento das diferenças, entre

a maioria das amostras, ao longo do estudo. Ao final de 104 dias já é visível uma pequena diferença significativa entre as amostras Tvr- G e Tr-I

4.4.3. Análise microbiológica das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé

Tabela 16: Resultados das análises microbiológicas obtidas para amostras de vinho rosé. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).

Amostra	Dias	Bolors e Leveduras		Bactérias		Brettanomyces	
TVR	0	incontável	incontável	1	1	0	0
	6	incontável	incontável	0	0	0	0
	31	incontável	incontável	0	0	0	0
	74	incontável	incontável	0	0	0	0
	105	incontável	incontável	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	31	0	0	0	0	0	0
	74	0	0	0	0	0	0
	105	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	31	0	0	0	0	0	0
	74	0	0	0	0	0	0
	105	0	0	0	0	0	0
I	0	2	5	0	0	0	0
	6	10	11	1	0	0	0
	31	0	0	0	0	0	0
	74	0	0	0	0	0	0
	105	0	0	0	0	0	0

As análises microbiológicas às amostras de vinho rosé (Tabela 16) demonstram que apenas as amostras sem qualquer tipo de estabilização, amostra TVR, possuem contaminações consistentes de bolors e leveduras ao longo dos cento e cinco dias. Quanto às restantes, observou-se a presença de colónias de bolors e leveduras nas amostras filtradas, amostras I. Contudo, apenas se visualizaram estas colónias na primeira e na segunda análise, isto é até à primeira semana após o engarrafamento. O desaparecimento dos bolors e leveduras durante o primeiro mês de estágio (trinta e um dias) em garrafa deverá dever-se à ação antimicrobiana do SO₂. Ainda sobre estas amostras, registou-se a

presença de uma colónia de bactérias na segunda análise, contudo sendo um caso isolado possivelmente será uma contaminação cruzada.

4.4.4. Análise sensorial das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé

As amostras de vinho rosé foram ainda avaliadas sensorialmente, trinta e um dias após o engarrafamento. De modo a averiguar a existência de variações organolépticas entre amostras, os vinhos foram avaliados quanto à sua cor, ao seu aroma e ao seu sabor. Os resultados médios obtidos pela análise de cinco provadores encontram-se expostos na Figura 38.

Nas amostras de vinho rosé não são perceptíveis diferenças significativas ($p > 0,05$) ao nível da cor. Em todas as amostras atribuiu-se uma pontuação de seis valores à tonalidade vermelha, sendo esta a tonalidade principal. Todas as amostras demonstraram uma limpidez elevada e uma intensidade de cor intermédia. As principais variações foram observadas no aroma, contudo não se observaram ser estatisticamente significativas. A amostra que evidenciou os aromas mais intensificados foi a amostra testemunha, mais concretamente os aromas frutados e floral e a intensidade geral dos aromas. A amostra pasteurizada com enchimento a frio demonstrou possuir as menores pontuações no que toca ao aroma frutado e floral, ao equilíbrio geral dos aromas e à intensidade dos mesmos. As amostras H e I (pasteurizada com enchimento a quente e amostra filtrada, respetivamente) são muito semelhantes entre si e são as que mais se assemelham à amostra testemunha. Em termos de sabor, é um vinho com algum equilíbrio, possui uma persistência, uma acidez, um corpo e uma doçura intermédia.

Ling *et al* (2019) ao estudar a evolução sensorial de vinho rosé e branco detetou uma diminuição da intensidade do aroma, ao longo de 18 meses. Contudo observou também que esta diminuição foi superior para vinhos brancos.

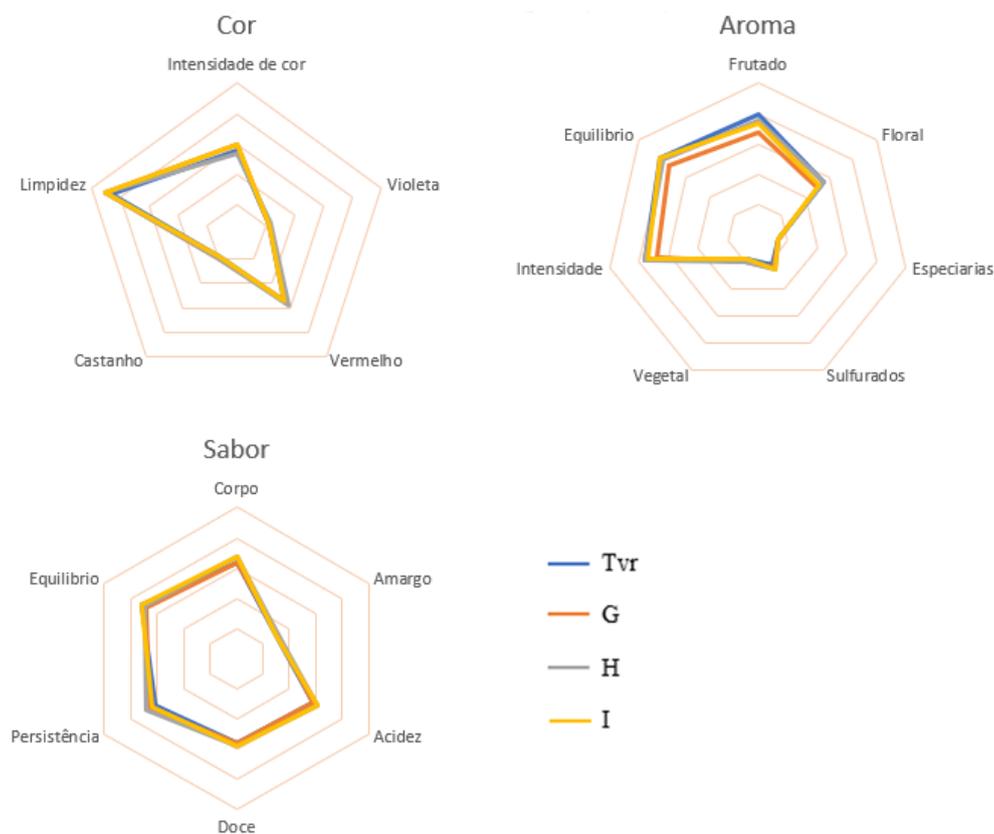


Figura 38: Pontuações médias da análise sensorial para as amostras de vinho rosé envolvidas, no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra Tvr (Amostra testemunha do ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho rosé), amostra G (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra H (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra I (amostra filtrada).

No curto período do presente estudo apenas se encontraram diferenças significativas nas diferenças colorimétricas. Contudo estas diferenças são pequenas e está presente para amostras pasteurizadas e filtradas. Deste modo pode-se concluir que, para vinho rosé, a utilização quer da filtração, quer da pasteurização poderão ser utilizadas para a estabilização microbiológica pré-engarrafamento.

4.5 Ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica de vinho branco.

Nos vinhos brancos não se realizaram as análises aos compostos fenólicos, uma vez que os compostos fenólicos avaliados neste estudo não estão presentes de todo ou pelo menos não de forma significativa, neste tipo de vinhos. Assim, avaliaram-se apenas as diferenças colorimétricas, a eficácia da estabilização microbiológica e as diferenças

sensoriais entre as amostras. Neste ensaio recolheram-se amostras de três tipos, amostras pasteurizadas com enchimento a frio (amostra D), amostras pasteurizadas com enchimento a quente (amostra E), amostras filtradas (amostra F). Durante cada ensaio de recolha das amostras, dez minutos antes e logo após a recolha, foram medidas as temperaturas do vinho em diferentes pontos do processo. As temperaturas registadas encontram-se na tabela 17.

Tabela 17: Temperaturas de exposição do vinho, desde o processo de pasteurização até ao seu engarrafamento, durante a recolha das amostras de vinho branco

	<i>Vinho Branco</i> <i>(enchimento a frio)</i>		<i>Vinho branco</i> <i>(enchimento a quente)</i>	
<i>Tempo (minutos)</i>	0	10	0	10
<i>Visor do pasteurizador (°C)</i>	100	100	91	90
<i>T de saída do pasteurizador (°C)</i>	22	22	54	54
<i>Visor do BIB (°C)</i>	24.6	24	47.7	47
<i>T de saída do BIB (°C)</i>	24	24	35	36
<i>Garrafa após enchimento (°C)</i>	24	24	40	40

4.5.1. Análise da cor das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho branco

As diferenças colorimétricas (ΔE) entre as amostras foram obtidas através do recurso ao CIELab. Os resultados obtidos referentes a esta análise encontram-se na tabela 18.

Tabela 18: Diferenças colorimétricas, entre amostras de vinho branco, obtidas pela técnica de CIELab. Amostra D (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra E (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra F (amostra filtrada)

<i>ΔE</i>	<i>Dias</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>
<i>D</i>	0	0	0,12	0,21
	7	0	0,72	0,39
	35	0	0,14	0,40
	75	0	0,26	0,37
	104	0	0,48	0,47
<i>E</i>	0	0,12	0	0,32
	7	0,72	0	0,77
	35	0,14	0	0,32
	75	0,26	0	0,19
	104	0,48	0	0,13
<i>F</i>	0	0,21	0,32	0
	7	0,39	0,77	0
	35	0,40	0,32	0
	75	0,37	0,19	0
	104	0,47	0,13	0

Como nas amostras de vinho rosé, as amostras de vinho branco (Tabela 18), até ao momento, não demonstraram diferenças colorimétricas significativas entre si. Isto é, por enquanto não existem diferenças visuais perceptíveis ao olho humano significativas.

4.5.2. Análise microbiológica das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho branco

Tabela 19: Resultados das análises microbiológicas obtidas para amostras de vinho branco. Amostra D (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra E (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra F (amostra filtrada).

<i>Amostra</i>	<i>Dias</i>	<i>Bolores e Leveduras</i>		<i>Bactérias</i>		<i>Brettanomyces</i>	
<i>D</i>	0	3	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	31	0	0	0	0	0	0
	73	0	0	0	0	0	0
	104	0	0	0	0	0	0
<i>E</i>	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	31	0	0	0	0	0	0
	73	0	0	0	0	0	0
	104	0	0	0	0	0	0
<i>F</i>	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	31	0	0	0	0	0	0
	73	0	0	0	0	0	0
	104	0	0	0	0	0	0

A partir da Tabela 19 é visível a inexistência de qualquer colônia de microrganismos ao longo dos cento e quatro dias, com exceção da amostra pasteurizada com enchimento a frio na primeira análise, na qual se registaram 3 e 5 colônias de bolores e leveduras. Estas colônias possivelmente desapareceram devido ao efeito antimicrobiano do SO₂ L.

4.5.3. Análise sensorial das amostras referentes ao ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica em vinho branco

As amostras de vinho branco foram ainda avaliadas sensorialmente, um mês após o engarrafamento. De modo a averiguar a existência de variações organolépticas entre amostras, os vinhos foram avaliados quanto à sua cor, ao seu aroma e ao seu sabor. Os resultados médios obtidos pela análise de cinco provadores encontram-se expostos na Figura 39.

Nas amostras de vinho branco não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) ao nível da cor. Todas as amostras demonstraram ter uma cor maioritariamente cítrica, com um alto nível de limpidez. Ao nível do aroma, a principal variação foi no aroma sulfurado, no qual as amostras D e E, ou seja, as amostras pasteurizadas obtiveram uma pontuação um pouco superior neste parâmetro, contudo não são estatisticamente significativas. No sabor, as amostras são muito semelhantes, à exceção da amargura, na qual a amostra filtrada (F) obteve uma pontuação um pouco inferior em relação às restantes, contudo esta diferença não chega a ser estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No requisito do sabor, o vinho em relação ao equilíbrio e à persistência obteve uma pontuação de 7, uma doçura e um corpo intermédio, uma amargura baixa e uma elevada acidez.

Malletroit *et al* (1991) num estudo onde avaliou os efeitos da pasteurização na composição, nas propriedades organolépticas e na estabilização microbiológica recorreu a testes duo-trio para comparar as características sensoriais de vinhos brancos. Neste estudo não se detetaram diferenças significativas entre as amostras pasteurizadas e não pasteurizadas.

Ling *et al* (2019) ao estudar a evolução dos perfis sensoriais do vinho branco e rosé ao longo de dezoito meses observou uma tendência de diminuição na intensidade aromática do vinho branco. Sims *et al* (1990) não observaram diferenças significativa na intensidade aromática entre amostras de vinho branco filtrado e não filtrado Já Peri *et al* (1988)., numa prova sensorial não detetou variações significativas no corpo e na adstringência entre amostras de vinho filtradas e amostras não filtradas.

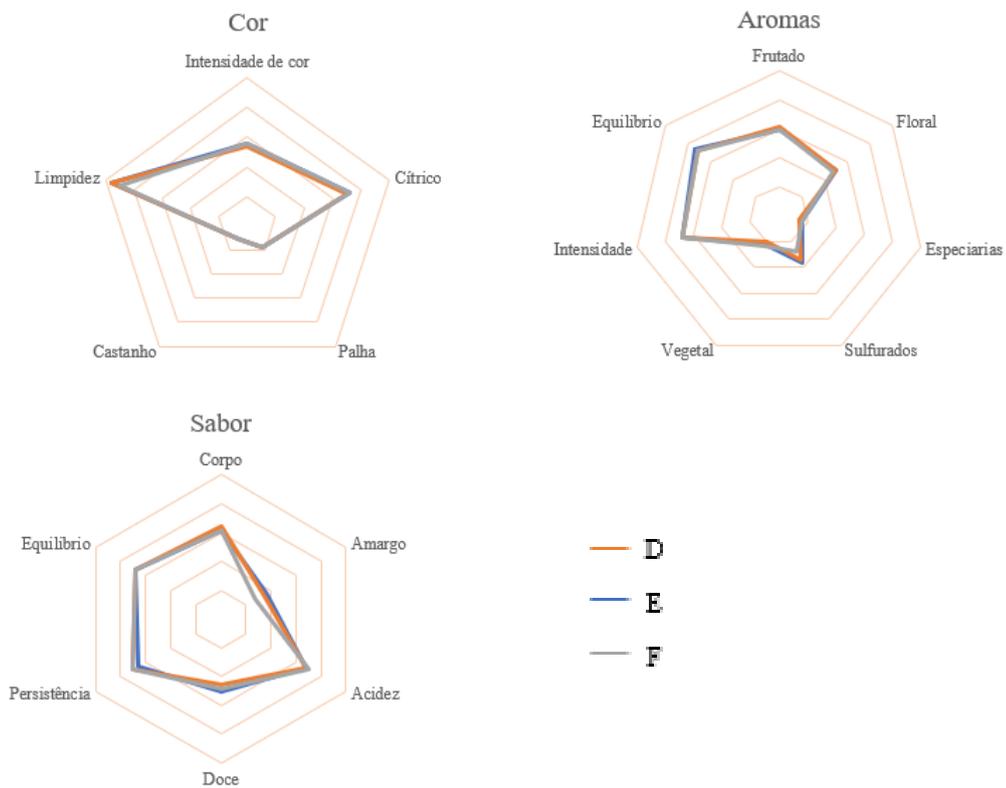


Figura 39: Pontuações médias da análise sensorial para as amostras de vinho branco, no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica. Amostra D (amostra pasteurizada com enchimento a frio), amostra E (amostra pasteurizada com enchimento a quente), amostra F (amostra filtrada)

Neste ensaio, igualmente aos referidos acima, pode-se concluir que no período avaliado ambas as técnicas utilizadas não afetam a qualidade do vinho.

5. Conclusão

O presente estudo permitiu não só comparar os efeitos na qualidade do vinho provocados pela filtração e pasteurização anteriores ao engarrafamento, bem como avaliar o efeito das diferentes velocidades de enchimento e conseqüentes variações da temperatura de exposição do vinho durante a pasteurização. Este estudo apresenta ainda a vantagem de não se cingir a um único tipo de vinho. Ao invés disso, são avaliados os efeitos de diferentes metodologias de estabilização microbiológica em três tipos de vinho, isto é, vinho tinto, rosé e branco. Para além disto, o presente estudo apresenta uma visão bastante holística na avaliação dos parâmetros de qualidade. Neste cruzam-se análises sensoriais, físico-químicas e microbiológicas.

Apesar destas vantagens o estudo apresenta algumas limitações. Começando pelo curto período do estudo. Neste estudo, dependendo do ensaio, foi avaliado o estágio em garrafa ao longo de 150, 69, 105 e 104 dias do vinho tinto (do ensaio comparativo de velocidade de enchimento), do vinho tinto (do ensaio comparativo entre pasteurização flash e filtração), do vinho rosé e do vinho branco, respetivamente. Outros trabalhos mencionados realizaram-se em janelas de tempo mais alargadas o que permitiu uma visão mais clara da evolução. Este curto período de tempo pode ainda não ser suficiente para detetar alterações que possam surgir mais tarde, o que pode ser significativo do ponto de vista comercial, uma vez que é espectável que o vinho demore um ano a chegar até ao consumidor final. Uma outra desvantagem deste estudo relaciona-se com as provas sensoriais. Estas foram realizadas apenas com testes descritos, o que não permite avaliar de forma concreta a existência de diferenças entre amostras. Deveriam ter sido usados teste triangulares ou *duo-trio*, contudo devido ao número elevado de provadores necessários e ao tempo reduzido do estudo não foi possível a sua aplicação. Ainda sobre as provas sensoriais, estavam previstas mais análises contudo devido à situação de saúde pública atual as mesmas não se puderam realizar, o que acabou por permitir apenas uma análise para as amostras de vinho rosé e branco e não permitiu a análise do segundo ensaio com vinho tinto, isto é, o ensaio comparativo entre diferentes metodologias de estabilização microbiológica.

Posto tudo isto referido acima e segundo os resultados podem-se retirar algumas conclusões. A primeira é que a velocidade de enchimento de vinho pasteurizado não

interfere com a qualidade do vinho. Esta é uma mais valia para a empresa em questão uma vez que se confirmou que uma produção superior não interfere com as características do vinho, pelo menos durante o tempo estudado. A segunda conclusão retirada aplica-se ao vinho tinto, rosé e branco. Nestes vinhos testaram-se a eficiência da estabilização microbiológica da pasteurização e da filtração e os seus efeitos nos parâmetros qualitativos do vinho. Os resultados permitiram concluir que ambas as técnicas são eficazes e para além disso nenhuma compromete as características físico-químicas e sensoriais do vinho, dentro do tempo estudado.

5.1. Trabalho futuro:

Como já referido este estudo poderá não ser representativo de todo o período de vida do vinho como produto final. Deste modo as análises deveriam de decorrer por mais algum tempo, pelo menos até às amostras completarem um ano, isto porque é este o tempo de vida espectável do vinho.

Seria interessante também a aplicação de outras técnicas de estabilização microbiológica nomeadamente o ácido ascórbico com o intuito de reduzir os valores de anidrido sulfuroso adicionados.

Referências Bibliográficas

- Barth, J. E. (2007). Wine and Society: The Social and Cultural Context of a Drink. *Annals of Tourism Research*, 34(3), 816.
- Abca, E. E., & Akdemir Evrendilek, G. (2014). Processing of Red Wine by Pulsed Electric Fields with Respect to Quality Parameters. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 758–767.
- Ali, K., Maltese, F., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews*, Vol. 9, pp. 357–378.
- Anderson, K., & Pinilla, V. (2018). *What's in the annual database of global wine markets, 1835 to 2016*. Retrieved from www.seha.info
- Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W., & Lima, U. de A. (2001). *Biotecnologia industrial : biotecnologia na produção de alimentos* (p. 523).
- Ashenfelter, O., Gergaud, O., Storchmann, K., & Ziemba, W. (2018). *World Scientific Reference on Handbook of the Economics of Wine*.
- Barril, C., Rutledge, D. N., Scollary, G. R., & Clark, A. C. (2016). Ascorbic acid and white wine production: a review of beneficial versus detrimental impacts. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(2), 169–181.
- Barril, Célia, Clark, A. C., & Scollary, G. R. (2012). Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. *Analytica Chimica Acta*, 732, 186–193.
- Bartowsky, E. (2017). Microbiology of winemaking. *Microbiology Australia*. <https://doi.org/10.1071/ma17033>
- Bartowsky, E. J. (2009, February). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 48, pp. 149–156.
- Basso, F., Guajardo, M., & Varas, M. (2018). Collaborative job scheduling in the wine bottling process. *Omega (United Kingdom)*, 91.
- Baumes, R. (2009). Wine aroma precursors. In *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 251–274).
- Bimpilas, A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry*, 197, 39–46.
- Bisson, L. F., & Joseph, C. M. L. (2009). Yeasts. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 47–60).
- Bisson, L. F., Waterhouse, A. L., Ebeler, S. E., Walker, M. A., & Lapsley, J. T. (2002, August 8). The present and future of the international wine industry. *Nature*, Vol. 418, pp. 696–699.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1999). Principles and Practices of Winemaking. In *Principles and Practices of Winemaking*.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E., Boulton, R. B., Singleton, V. L., ... Kunkee, R. E. (1999). Microbiological Spoilage of Wine and its Control. In *Principles and Practices of Winemaking* (pp. 352–381).
- Buffon, P., Heymann, H., & Block, D. E. (2014). Sensory and chemical effects of cross-flow filtration on white and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(3), 305–314.

- Burin, V. M., Freitas Costa, L. L., Rosier, J. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2011). Cabernet Sauvignon wines from two different clones, characterization and evolution during bottle ageing. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(9), 1931–1938.
- Butnariu, M., & Butu, A. (2019). Qualitative and Quantitative Chemical Composition of Wine. In *Quality Control in the Beverage Industry* (pp. 385–417).
- Buzrul, S. (2012, January). High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Vol. 13, pp. 1–12.
- Campaniello, D., & Sinigaglia, M. (2017). Wine Spoiling Phenomena. In *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers* (pp. 237–255).
- Campbell, G., & Guibert, N. (2007). Wine, society, and globalization: Multidisciplinary perspectives on the wine industry. In *Wine, Society, and Globalization: Multidisciplinary Perspectives on the Wine Industry*.
- Cassino, C., Tsolakis, C., Bonello, F., Gianotti, V., & Osella, D. (2019). Wine evolution during bottle aging, studied by 1H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Food Research International*, *116*, 566–577.
- Chris Somers, T., & Evans, M. E. (1977). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “chemical age.” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *28*(3), 279–287. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280311>
- Comuzzo, P., & Calligaris, S. (2019). Potential Applications of High Pressure Homogenization in Winemaking: A Review. *Beverages*, *5*(3), 56.
- Cosme, F., Vilela, A., Filipe-Ribeiro, L., Inês, A., & Nunes, F. M. (2017). Wine Microbial Spoilage: Advances in Defects Remediation. In *Microbial Contamination and Food Degradation* (pp. 271–314).
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, *25*(2), 422–427.
- Crowell, E. A., & Guymon, J. F. (1975). Wine Constituents Arising from Sorbic Acid Addition, and Identification of 2-Ethoxyhexa-3,5-Diene as Source of Geranium-Like Off-Odor. *American Journal of Enology and Viticulture*, *26*(2).
- Das, S., Santani, D. D., & Dhalla, N. S. (2007). Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine. *Experimental and Clinical Cardiology*, Vol. 12, pp. 5–10.
- Delsart, C., Grimi, N., Boussetta, N., Miot Sertier, C., Ghidossi, R., Vorobiev, E., & Mietton Peuchot, M. (2016). Impact of pulsed-electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, *120*(1), 152–164.
- Duarte, F. L., Coimbra, L., & Baleiras-Couto, M. (2017). Filter media comparison for the removal of *Brettanomyces bruxellensis* from wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *68*(4), 504–508.
- Edwin, H. (1980). In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, *19*(12), 2577–2582.
- Escott, C., Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M. A., & Suárez-Lepe, J. A. (2017). Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy. In *Yeast - Industrial Applications*.
- Evrendilek, G. A., Li, S., Dantzer, W. R., & Zhang, Q. H. (2004). Pulsed Electric Field Processing of Beer: Microbial, Sensory, and Quality Analyses. *Journal of Food Science*, *69*(8), M228–M232.
- Fischer, U. (2007). Wine aroma. In *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing*

- and Sustainability (pp. 241–267).
- Fredericks, I. N., du Toit, M., & Krügel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, 28(3), 510–517.
- Fugelsang, K. C. (1997a). Bottling. In *Wine Microbiology* (pp. 143–158).
- Fugelsang, K. C. (1997b). Wine Microbiology. In *Wine Microbiology*.
- Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). Wine microbiology: Practical applications and procedures. In *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*.
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic Reactions during Winemaking and Aging-289 Polyphenol and Flavonoid Reactions Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. In *Am. J. Enol. Vitic* (Vol. 57).
- García-Ríos, E., Ruiz-Rico, M., Guillamón, J. M., Pérez-Esteve, É., & Barat, J. M. (2018). Improved antimicrobial activity of immobilised essential oil components against representative spoilage wine microorganisms. *Food Control*, 94, 177–186. h
- Giacosa, S., Río Segade, S., Cagnasso, E., Caudana, A., Rolle, L., & Gerbi, V. (2019). SO2 in Wines: Rational Use and Possible Alternatives. *Red Wine Technology*, 309–321.
- Gracin, L., Jambrak, A. R., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., & Smoljanić, G. (2016). Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Applied Acoustics*, 103, 143–147.
- Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015, March 1). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 42, pp. 27–43.
- Instituto dos vinhos do Douro e Porto. (2018). Nota técnica acidez volátil Porto. Retrieved from [https://www.ivdp.pt/pt/docs/Nota técnica acidez volátil Porto 2018.pdf](https://www.ivdp.pt/pt/docs/Nota_técnica_acidez_volátil_Porto_2018.pdf)
- Instituto dos Vinhos do Douro e Porto (2008). Relatório dos ácidos 2008. Retrieved from: https://www.ivdp.pt/pt/docs/Relatorio%20acidos_2008_1.pdf
- Jackson, R. (2016). Shelf Life of Wine. In *The Stability and Shelf Life of Food* (pp. 311–346).
- Jackson, Ron S. (2008). Wine science: principles and applications. Elsevier/Academic Press.
- Jackson, Ronald S. (2014). Post-Fermentation Treatments and Related Topics. In *Wine Science* (pp. 535–676).
- Jenster, P. V., & Jenster, L. (1993). The European Wine Industry. *International Journal of Wine Marketing*, 5(1), 30–73. <https://doi.org/10.1108/eb008610>
- Kennedy, J. A. (2010). Wine colour. In *Managing Wine Quality: Viticulture and Wine Quality* (pp. 73–104).
- Kitis, M. (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review. *Environment International*, 30(1), 47–55.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008, May 1). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, Vol. 108, pp. 1–13.
- Liburdi, K., Benucci, I., & Esti, M. (2014). Lysozyme in Wine: An Overview of Current and Future Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1062–1073.
- Ling, M. Q., Xie, H., Hua, Y. B., Cai, J., Li, S. Y., Lan, Y. Bin, ... Shi, Y. (2019). Flavor profile evolution of bottle aged rosé and white wines sealed with different closures. *Molecules*, 24(5).
- Linsenmeier, A. W., Rauhut, D., & Sponholz, W. R. (2010). Ageing and flavour

- deterioration in wine. In *Managing Wine Quality* (pp. 459–493).
- Lukić, K., Brnčić, M., Čurko, N., Tomašević, M., Valinger, D., Denoya, G. I., ... Ganić, K. K. (2019). Effects of high power ultrasound treatments on the phenolic, chromatic and aroma composition of young and aged red wine. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59.
- Luo, H., Schmid, F., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2012). Viability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.06.009>
- Malfeito-Ferreira, M. (2014). Wines: Wine Spoilage Yeasts and Bacteria. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 805–810).
- Malletroit, V., Guinard, J. -X, Kunkee, R. E., & Lewis, M. J. (1991). Effect of pasteurization on microbiological and sensory quality of white grape juice and wine. *Journal of Food Processing and Preservation*, 15(1), 19–29.
- Mander, L., & Liu, H. W. (2010). Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology. In *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* (Vol. 1).
- Marriott, N. G., & Gravani, R. B. (2006). *Principles of food sanitation*. Springer.
- Matias, F., Pinto, A. F., Torgal, I., Alves, M., Grácio, J., & Mira, and H. (2016). The Ultraviolet radiation (UV-C) for the microbiological stabilization of red wine. *BIO Web of Conferences*, 7, 02013.
- McRae, J. M., Mierczynska-Vasilev, A., Soden, A., Barker, A. M., Day, M. P., & Smith, P. A. (2017). Effect of commercial-scale filtration on sensory and colloidal properties of red wines over 18 months bottle aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68(3), 263–274.
- Mok, C., Song, K.-T., Park, Y.-S., Lim, S., Ruan, R., & Chen, P. (2006). High Hydrostatic Pressure Pasteurization of Red Wine. *Journal of Food Science*, 71(8), M265–M269.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2006). Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chemistry*, 95(3), 405–412.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2005, June). Winemaking biochemistry and microbiology: Current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 45, pp. 265–286.
- Morozova, K., Schmidt, O., & Schwack, W. (2015). Effect of headspace volume, ascorbic acid and sulphur dioxide on oxidative status and sensory profile of Riesling wine. *European Food Research and Technology*, 240(1), 205–221.
- Nieto-Rojo, R., Luquin, A., & Ancín-Azpilicueta, C. (2015). Improvement of wine aromatic quality using mixtures of lysozyme and dimethyl dicarbonate, with low SO₂ concentration. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 32(12), 1965–1975.
- Peri, C., Riva, M., & Decio, P. (1988). Crossflow Membrane Filtration of Wines: Comparison of Performance of Ultrafiltration, Microfiltration, and Intermediate Cut-Off Membranes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(2).
- Puech, C., Vidal, S., Pegaz, J.-F., Riou, C., & Uchot, P. V. (2006). Effect of storage conditions on the evolution of bottled wines. *Com internet Journal of Viticulture and Oenology*, 33, 1–8.
- Quaglieri, C., Prieto-Perea, N., Berrueta, L. A., Gallo, B., Rasines-Perea, Z., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2017). Comparison of aquitaine and Rioja red wines: Characterization of their phenolic composition and evolution from 2000 to 2013.
- Rapp, A., & Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia*, 42(8), 873–884.
- Recamales, Á. F., Sayago, A., González-Miret, M. L., & Hernanz, D. (2006). The effect of

- time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International*, 39(2), 220–229.
- Revilla, I., & González-Sanjosé, M. L. (2001). Evolution during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: New anthocyanin pigment formation. *International Journal of Phytoremediation*, 21(1), 183–197.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006). Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications: Second Edition. In *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications: Second Edition* (Vol. 1).
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition. In *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition* (Vol. 2).
- Ribereau-Gayon, Pascal. (1982). The Anthocyanins of Grapes and Wines. In *Anthocyanins As Food Colors* (pp. 209–244).
- Rizzon, L. A., & Miele, A. (1996). Extrato seco total de vinhos brasileiros: comparação de métodos analíticos. *Ciência Rural*, 26(2), 297–300.
- Robertson, G. (2005). *Food packaging: principles and practice*.
- Robinson, W. B., Weirs, L. D., Bertino, J. J., & Mattick, L. R. (1966). The Relation of Anthocyanin Composition to Color Stability of New York State Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 17(3).
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 169–180.
- Ronald S. Jackson. (2014). *Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson*.
- Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction-197. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197–206.
- Sampedro, F., McAloon, A., Yee, W., Fan, X., & Geveke, D. J. (2014). Cost Analysis and Environmental Impact of Pulsed Electric Fields and High Pressure Processing in Comparison with Thermal Pasteurization. *Food and Bioprocess Technology*, 7(7), 1928–1937.
- Santiago, A. C., Munoz, R., & Garcia, R. G. (2011). Molecular Wine Microbiology. In *Molecular Wine Microbiology*.
- Santos, M. C., Nunes, C., Rocha, M. A. M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2015). High pressure treatments accelerate changes in volatile composition of sulphur dioxide-free wine during bottle storage. *Food Chemistry*, 188, 406–414.
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2012, January). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, Vol. 234, pp. 1–12.
- Sims, C. A., Bates, R. P., & Johnson, R. P. (1990). Comparison of Pre- and Post-Fermentation Ultrafiltration on the Characteristics of Sulfited and Non-Sulfited White Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(2).
- Steiner, T. E., Butzke, C., Payette, T. J., & Gibson, R. (2010). Wine packaging and storage. In *Winemaking Problems Solved* (pp. 150–198).
- Strobl, M. (2019). Red Wine Bottling and Packaging. In *Red Wine Technology* (pp. 323–339).

- Stupino, M., Giacosa, E., & Pollifroni, M. (2019). Tradition and Innovation Within the Wine Sector: How a Strong Combination Could Increase the Company's Competitive Advantage. In *Processing and Sustainability of Beverages* (pp. 185–204).
- Suárez, R., Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2007). Phenolic Composition and colour of *Vitis vinifera* L. cv Merlot wines from different vintages and aging time in bottle. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 22(2), 35–44.
- The International Organisation of Vine and Wine. (2019). Annex maximum acceptable limits. Retrieved from <http://www.oiv.int/public/medias/3741/e-code-annex-maximum-acceptable-limits.pdf>
- The International Organisation of Vine and Wine (2019). 2019 Statistical Report on World Vitiviniculture. Retrieved from: <http://www.oiv.int/public/medias/6782/oiv2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf>
- The International Organisation of Vine and Wine. (2019). Volatile acidity, fixed acidity, organic acids:p163-170. Retrieved from <http://www.oiv.int/public/medias/3732/oiv-ma-as313-02.pdf>
- The International Organisation of Vine and Wine. (2020). International code of oenological practices. Retrieved from <http://www.oiv.int/public/medias/7213/oiv-international-code-of-oenological-practices-2020-en.pdf>
- Ubeda, J. F., & Briones, A. I. (1999). Microbiological quality control of filtered and non-filtered wines. *Food Control*, 10(1), 41–45.
- Ugliano, M. (2013). Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6125–6136.
- van Wyk, S., & Silva, F. V. M. (2017). High pressure inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Microbiology*, 63, 199–204.
- van Wyk, S., & Silva, F. V. M. (2019). Nonthermal Preservation of Wine. In *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages* (pp. 203–235).
- van Wyk, S., Silva, F. V. M., & Farid, M. M. (2019). Pulsed electric field treatment of red wine: Inactivation of *Brettanomyces* and potential hazard caused by metal ion dissolution. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 52, 57–65.
- Waterhouse, Andrew L, Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry. Cap.31. Grape Genetics, Chemistry, and Breeding.* 2–5.
- Waterhouse, Andrew Leo., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). Understanding Wine Chemistry. In *Understanding Wine Chemistry*.
- Yang, N., Huang, K., Lyu, C., & Wang, J. (2016, March 1). Pulsed electric field technology in the manufacturing processes of wine, beer, and rice wine: A review. *Food Control*, Vol. 61, pp. 28–38.
- Zhang, Q. A., & Wang, T. T. (2017). Effect of ultrasound irradiation on the evolution of color properties and major phenolic compounds in wine during storage. *Food Chemistry*, 234, 372–380.

6. Anexos

6.1. Ficha de prova descritiva das amostras de vinho tinto envolvidas no ensaio comparativo entre velocidades de enchimento

Ficha de Avaliação Sensorial Comparativa

Nome: _____

Data: ____

Prova: Ensaio Pasteurização Vinho tinto

Numa escala de 1 a 10 classifique os atributos da seguinte forma: **Aspecto Visual, Aroma e Sabor:** 1 Menos a 10 Mais

Código da Amostra		A3F	N9T	L2X	J7O
ASPECTO VISUAL	Intensidade da cor	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Violeta	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Vermelho	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Castanho	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Limpidez	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
AROMA	Frutado	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Floral	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Balsâmico	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Especiaria	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Empireumático	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Sulfurado	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Vegetal	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Intensidade	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Equilíbrio	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
SABOR	Corpo	① ② ③ ④ ⑤	① ② ③ ④ ⑤	① ② ③ ④ ⑤	① ② ③ ④ ⑤

	⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Adstringência	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Amargo	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Acidez	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Doce	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Persistência	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Equilíbrio	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩

Obs.: _____

6.2. Ficha de prova descritiva das amostras de vinho rosé envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica

Nome: _____

Data: _____

Prova: Ensaio Pasteurização VS Filtração em vinho rosé

Numa escala de 1 a 10 classifique os atributos da seguinte forma: **Aspecto Visual**, **Aroma** e **Sabor**: 1 Menos a 10 Mais

Código da Amostra		Y1S	Z2B	C5H	T9W
ASPECTO VISUAL	Intensidade da cor	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Violeta	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Vermelho	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Castanho	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Limpidez	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
AROMA	Frutado	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Floral	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Especiaria	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Sulfurado	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Vegetal	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Intensidade	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩

	Equilíbrio	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
SABOR	Corpo	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Amargo	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Acidez	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Doce	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Persistência	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Equilíbrio	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩

Obs.: _____

6.3. Ficha de prova descritiva das amostras de vinho branco envolvidas no ensaio comparativo entre metodologias de estabilização microbiológica

Nome: _____ Data: _____

Prova: Ensaio Pasteurização VB Cabriz CS

Numa escala de 1 a 10 classifique os atributos da seguinte forma: **Aspecto Visual**, **Aroma** e **Sabor**: 1 Menos a 10 Mais

Código da Amostra		L5J	O3P	R7A
ASPECTO VISUAL	Intensidade da cor	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Cítrico	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Palha	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Castanho	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Limpidez	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
AROMA	Frutado	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Floral	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Especiaria	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Sulfurado	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Vegetal	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Intensidade	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Equilíbrio	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
SABOR	Corpo	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Amargo	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Acidez	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Doce	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
	Persistência	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩	① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩

	Equilibrio	①②③④⑤	①②③④⑤	①②③④⑤
		⑥⑦⑧⑨⑩	⑥⑦⑧⑨⑩	⑥⑦⑧⑨⑩

6.4. Reta de calibração da epicatequina utilizada no método da metil-celuloce precipitável.

A reta de calibração da epicatequina obteve-se pela leitura da absorvância a 280 nm de cinco soluções a diferentes concentrações de epicatequina. Para cada concentração realizaram-se três leituras, das quais se obteve o seguinte gráfico.

