

MESTRADO EM ENGENHARIA ALIMENTAR

Tamara do Carmo Ribeiro

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes

Orientador: Doutora Goreti Botelho

Coimbra, 2024

MESTRADO EM ENGENHARIA ALIMENTAR

Tamara do Carmo Ribeiro

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária de
Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de mestre em **Engenharia Alimentar**.

Orientador: Doutora Goreti Botelho

Coimbra, 2024

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus por sempre me instigar e motivar a buscar novos desafios. Também quero agradecer especialmente minha família: mãe, pai, irmãos Jean e Christian, madrinha e cunhadas, que acreditaram em mim e abriram mão de momentos em família, festas ou até mesmo um dia de piscina, compreendendo que eu estava crescendo e perseguindo os meus sonhos. Mesmo a mais de 8 mil quilómetros de distância, eles continuaram a torcer por mim e a compartilhar das minhas angústias.

Agradeço aos meus amigos brasileiros em Portugal, Rafaella e Caiuby. Vocês fizeram com que o Brasil não parecesse tão distante, sendo verdadeiros anjos em cada dia. Não posso deixar de agradecer à senhora Salete e ao senhor Santos das residências do Instituto Politécnico de Coimbra - São Martinho do Bispo, que sempre me trataram com atenção e carinho. Também sou grata às minhas “princesas-amigas” em Coimbra: a afilhada Matilde, à Inês Espanhol, Ana Simões, Diana, Daniela, Inês Sousa e Adriana. A cumplicidade e a amizade que partilhamos ao longo desse tempo tornaram esses dois anos em outro continente muito mais leves. Obrigada por tudo!

À professora Goreti Botelho, que me sugeriu um novo caminho a seguir e uma nova experiência para viver, o meu sincero agradecimento por mostrar esse “e se”. Agradeço à Catarina Flores pela ideia e desenvolvimento dos vinagretes e a parceria ao longo deste trabalho. Agradeço também à equipa da Global Wines S.A., que me acolheu. Ao engenheiro Paulo Prior, pela oportunidade, e, em especial, à Inês Santos, pela paciência em me aconselhar e a vontade de ensinar. À Joana, que tornou os dias mais divertidos e acreditou em mim, apesar das minhas limitações. À equipa de enologia, pela amizade, e em particular ao Miguel, por toda a atenção.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus avós Clarinda e Manuel. Eles, ao deixarem Portugal para tentar um futuro melhor no Brasil, foram exemplos de coragem para que eu arriscasse um mestrado em outro país. Que essa coragem continue a ser a herança da nossa família!

Resumo

Este relatório resultou de um estágio profissionalizante realizado no laboratório de Enologia da empresa Global Wines S.A., no âmbito do Mestrado em Engenharia Alimentar da Escola Superior Agrária de Coimbra. O trabalho realizado teve como objetivos, além de adquirir conhecimentos sobre o controlo da qualidade de vinhos, com a execução de métodos laboratoriais físico-químicos e microbiológicos, avaliar analítica e microbiologicamente vinagretes inovadores, elaborados com esferas de alginato de cálcio (um subproduto da produção de vinhos espumantes), e compará-los com amostras comerciais de vinagretes. Com a amostragem de seis tipos de vinagretes de formulações distintas, e três vinagretes comerciais diferentes, utilizou-se a metodologia descrita no “Compêndio dos Métodos Internacionais para Análises de Vinagres”, elaborado pela *International Organisation of Vine and Wine (OIV)* e também a metodologia interna da empresa para a análise microbiológica. Foi possível notar a importância do controlo da qualidade dos vinhos e das amostras de vinagretes em estudo. Constatou-se que duas das seis amostras elaboradas apresentaram presença de microrganismos, enquanto as comerciais não apresentaram contaminação microbiológica. Das análises químicas, concluiu-se que os resultados divergem da literatura existente sobre os vinagretes, demonstrando que as formulações dos vinagretes carecem de ajustes futuros na sua acidez total e no pH, para garantir estabilidade e segurança alimentar destes produtos. O trabalho realizado constitui uma oportunidade de contribuir para uma estratégia de sustentabilidade da empresa, uma vez que, a reutilização de subprodutos de vinificação é muito desejável para reduzir o volume de resíduos do processo produtivo numa adega.

Palavras-chave: Vinhos espumantes, leveduras encapsuladas, esferas de alginato de cálcio, sustentabilidade, vinagretes.

Abstract

This report resulted from a professional internship conducted at the Enology laboratory of Global Wines S.A., within the scope of the Master's degree in Food Engineering at the Coimbra Agriculture School in Coimbra. The work carried out aimed not only to acquire knowledge about wine quality control through physical-chemical and microbiological laboratory methods but also to analytically and microbiologically evaluate innovative vinaigrettes made with calcium alginate beads (a byproduct of sparkling wine production) and compare them with commercial vinaigrette samples. By sampling six different vinaigrette formulations and three distinct commercial vinaigrettes, we employed the methodology described in the “Compendium of International Methods for Vinegar Analysis,” developed by the International Organisation of Vine and Wine (OIV), as well as the company's internal methodology for microbiological analysis. It was evident that wine quality control and the vinaigrette samples were of paramount importance. Two out of the six prepared samples showed the presence of microorganisms, while the commercial ones remained free from microbiological contamination. Regarding chemical analyses, the results diverged from existing literature on vinaigrettes, highlighting the need for future adjustments in their total acidity and pH to ensure stability and food safety. This work represents an opportunity to contribute to the company's sustainability strategy, as reusing winemaking byproducts is highly desirable for reducing waste volume in the winery production process.

Keywords: Sparkling wines, encapsulated yeasts, calcium alginate beads, sustainability, vinaigrettes.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Lista de Figuras	viii
1. Introdução.....	1
1.1 Caracterização do estágio e da empresa	1
1.2 Regiões vitivinícolas de Portugal	3
1.3 A empresa e a sustentabilidade	6
1.4 Objetivos do estágio	9
2. O vinho	10
2.1 Produção de vinhos tranquilos.....	11
2.2 Produção de vinhos espumantes	12
2.2.1 Leveduras encapsuladas na produção de vinhos espumantes	17
2.3 A microbiologia dos vinhos e microrganismos de alteração	18
2.4 O vinagre e o vinho.....	20
3. Amostragem e Metodologia.....	22
3.1 Amostragem no controlo da qualidade dos vinhos	22
3.2 Metodologia no controlo da qualidade dos vinhos	22
3.2.1 Análises físico-químicas	22
3.2.1.1 Teor Alcoólico Volumétrico (OIV-MA-AS312-01).....	23
3.2.1.2 Acidez Volátil (OIV-MA-AS313-02)	23
3.2.1.3 Acidez Total (OIV-MA-AS313-01).....	24
3.2.1.4 Massa Volúmica (OIV-MA-AS2-01) e Extrato Seco Total (OIV-MA-AS2-03B)	24
3.2.1.5 pH (OIV-MA-AS313-15).....	25
3.2.1.6 Açúcares Redutores (OIV-AS311-01B).....	25
3.2.1.7 Dióxido de Enxofre Livre e Total (adaptado de OIV-MA-AS323-04B)	25
3.2.2 Análises microbiológicas	26
3.3 Amostragem no controlo da qualidade de vinagretes.....	27
3.4 Metodologia no controlo da qualidade de vinagretes	29
3.4.1 Análises físico-químicas	29

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

3.4.1.1	Determinação do pH (OIV-MA-AS313-15)	30
3.4.1.2	Determinação da acidez total (OIV-MA-VI-01: R2018)	30
3.4.1.3	Determinação de teor de cloreto de sódio (NaCl) (OIV-MA-VI-11: R2000).	30
3.4.2	Análises microbiológicas	31
4.	Resultados e discussão	32
4.1	Controlo da qualidade de vinhos	32
4.2	Controlo da qualidade de vinagretes	32
4.2.1	Análise química.....	32
4.2.2	Análise microbiológica	33
5.	Conclusão e sugestões.....	39
	Bibliografia	40
	ANEXO A - Ficha técnica do meio de cultura <i>Agar Nutriente</i> WL para deteção de Bolores e Leveduras da marca Condalab.	43
	ANEXO B - Ficha técnica do meio de cultura <i>Brettanomyces Agar</i> para deteção de <i>Brettanomyces</i> spp. da marca Condalab.....	45
	ANEXO C - Ficha técnica do meio de cultura WL <i>Differential Agar</i> para deteção de Bactérias Acéticas da marca Condalab.....	47

Lista de Figuras

Figura 1: Algumas das marcas de vinhos da Global Wines S.A.	2
Figura 2: Vinhos premiados no concurso "International Wine & Spirit Competition 2023"	2
Figura 3: Regiões vitivinícolas de Portugal.	4
Figura 4: Região demarcada do Dão.	5
Figura 5: Castas das uvas tintas e brancas da região do Dão, segundo o Anuário 2022 do Instituto da Vinha e do Vinho.	6
Figura 6: 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.	7
Figura 7: Produção mundial de vinho em 2023 em volume (Milhões/ hL)	8
Figura 8: Curva de crescimento característica da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Figura 9: Fluxograma genérico de produção de vinhos tranquilos (brancos, rosés e tintos) ...	12
Figura 10: Fluxograma genérico da produção de vinho espumante pelo método clássico	14
Figura 11: Fermentação alcoólica	16
Figura 12: Classificação de açúcares nos vinhos espumantes em Portugal (Reg. (Ce) Nº 607/2009).	17
Figura 13: Esquema genérico de preparação de vinagretes.	21
Figura 14: Amostras de diferentes tipos de molho vinagrete comercial VC1, VC2 e VC3, respetivamente.....	29
Figura 15: Potenciómetro para determinação do pH de amostras aquosas.	30
Figura 16: Determinação da acidez total por titulação.....	30
Figura 17: Inoculação (n=1) de diferentes volumes (100µL, 200µL, 500µL e 1000 µL) no meio WLN das amostras 463 (superior) e 501 (inferior).	34
Figura 18: Amostras 463 e 501 de vinagrete inoculadas em meio de cultura WLN.....	34
Figura 19: Amostras 463 e 501 de vinagrete inoculadas em meio de cultura WL <i>Differential</i>	34
Figura 20: Amostras V1, V2, V3 e V4 de vinagrete inoculadas em meio de cultura WLN. ...	35
Figura 21: Amostras V1, V2, V3 e V4 de vinagrete em meio de cultura WL <i>Differential</i>	35
Figura 22: Amostras comerciais de vinagrete (VC1, VC2 e VC3) inoculadas em meio de cultura WLN.....	36
Figura 23: Amostras comerciais de vinagrete (VC1, VC2 e VC3) inoculadas em meio de cultura WL <i>Differential</i>	36

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

Figura 24: Amostras de vinagretes (501 e 463, respetivamente) expostas a temperatura ambiente durante um período de 30 dias.	37
Figura 25: Amostras de vinagretes (V1, V2, V3 e V4, respetivamente) expostas a temperatura ambiente durante um período de 30 dias.....	37
Figura 26: Inoculação de leveduras encapsuladas após segunda fermentação em meio de cultura WLN.....	38

Lista de Tabelas

Tabela 1: Microrganismos que podem causar alterações no vinho.....	19
Tabela 2: Concentrações limites legais de SO ₂ nos vinhos.....	26
Tabela 3: Composição das diferentes amostras de vinagretes elaboradas.	28
Tabela 4: Composição das diferentes amostras de vinagretes comerciais, segundo rotulagem própria das marcas.....	29
Tabela 5: Valores médios dos parâmetros analíticos das 9 amostras de vinagrete (média $\pm$ desvio padrão, n= 3).	32

1. Introdução

1.1 Caracterização do estágio e da empresa

O estágio curricular foi realizado no laboratório de Enologia da empresa **Global Wines S.A.**, em Carregal do Sal. A sua duração foi de, aproximadamente, 1000 horas e decorreu no âmbito do Mestrado em Engenharia Alimentar da Escola Superior Agrária de Coimbra, do Instituto Politécnico de Coimbra. A empresa situa-se na região demarcada pelo rio a que nomeia a maior parte de sua produção – o rio Dão. Foi fundada em 1990 e é atualmente uma das maiores produtoras de vinhos de Portugal e a maior produtora na região do Dão. Está presente em mais de 40 países, e comercializa vinhos provenientes das regiões da Bairrada, Alentejo, Douro e Vinhos Verdes. Trata-se de uma empresa localizada no concelho de Carregal do Sal, distrito de Viseu e atualmente possui um portfólio variado com produção de vinhos comuns tranquilos (brancos, rosés e tintos), vinhos licorosos, vinhos espumantes e aguardente vínica (Global Wines S.A., 2024a).

Ainda que a sua atividade principal seja a produção, o engarrafamento e a comercialização de vinhos, a empresa também atua no sector do enoturismo com os seus espaços vitivinícolas detentores de vastas quintas além de contar com o setor gastronómico nos seus três restaurantes: Paço dos Cunhas (Santar, Nelas), Quinta do Encontro (Anadia) e Quinta de Cabriz (Carregal do Sal). Com um volume anual de produção de aproximadamente 7.300.000 garrafas, a Global Wines S.A. tem vindo a alcançar alguns prémios com as marcas 1990 Premium Wines (Casa de Santar, Vinha do Contador, Quinta do Encontro e Saturno), Cabriz (Cabriz Colheita Seleccionada Tinto, sendo considerado “o Dão mais vendido do mundo”), além de outras marcas como, por exemplo, Xadrez, Vinha Maria, Cortello, Herdade Monte da Cal, Berço do Infante, Astrolabium e Grilos (Global Wines S.A., 2024a) (**Figura 1**).

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.



Figura 1: Algumas das marcas de vinhos da Global Wines S.A.

Dentro do leque de prémios conquistados, podemos destacar a medalha de prata para o Cabriz Reserva Branco e Casa de Santar Branco e Tinto no concurso *International Wine & Spirit Competition 2023* (Figura 2), a medalha de prata para o Saturno Reserva Branco e Vinha de Saturno Branco no concurso *Decanter World Wine Awards 2023* e o “Melhor da Região – Dão” no concurso *Vinum – Best of Portugal 2024* para o Casa de Santar Tinto. A empresa produz ainda vinhos fora da Europa, no Brasil em Pernambuco, onde a marca Rio Sol tem vindo a ganhar notoriedade internacional através de exportações para os Estados Unidos e através da *Nam Kwong Wines & Spirits*, uma empresa parceira na comercialização dos vinhos da Global Wines S.A. na China, que tem permitido também ampliar as suas vendas no mercado asiático (Global Wines S.A., 2024a).



Figura 2: Vinhos premiados no Concurso "International Wine & Spirit Competition 2023"

A nível organizacional, a empresa possui equipas bem definidas e com formações diversas para as suas áreas de atuação. O foco da Global Wines S.A. centra-se na qualidade dos seus produtos, possuindo certificações de qualidade e segurança alimentar como a IFS Food e ISO 9001. O controlo de qualidade dos seus produtos e processos tem como base os princípios de um plano de HACCP - *Hazard Analysis Critical Control Point* (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo), que exige monitorizações diárias dos pontos de controlo e dos pontos críticos de controlo desde o momento de receção das uvas até ao engarrafamento constando no Manual de Segurança Alimentar (Global Wines S.A., 2024b).

1.2 Regiões vitivinícolas de Portugal

Após alguns anos a tentar estabelecer um panorama das regiões vitivinícolas em Portugal, em 1755, Marquês de Pombal, ministro do rei à data, estabeleceu uma fronteira em torno do Douro e, entre 1908 e 1979, a maioria dos vinhos portugueses ainda não possuía identificação regional para a sua comercialização. Apenas em 1986, quando Portugal aderiu à Comunidade Económica Europeia (antecessora à União Europeia), foi-lhe dada a ordem para modificar alguns costumes e elaborou-se assim, uma forma de denominação hierárquica segundo as categorias regionais e classificação vitivinícola (Mayson, 2003).

Para a classificação de um vinho a ser comercializado numa região conforme a “Denominação de Origem Controlada (DOC)”, é necessário que os produtores pertençam a determinada região, com tradição e características semelhantes, classificadas pela geografia e pelos fatores naturais. Baseado na diferenciação dos solos e das condições climáticas, foi possível proceder à classificação das regiões demarcadas vitivinícolas de Portugal, de norte a sul do país, incluindo as ilhas, e que sofreu algumas modificações até chegar à classificação atual conforme o Instituto da Vinha e do Vinho (IVV) ilustra (**Figura 3**) (IVV, 2022b).

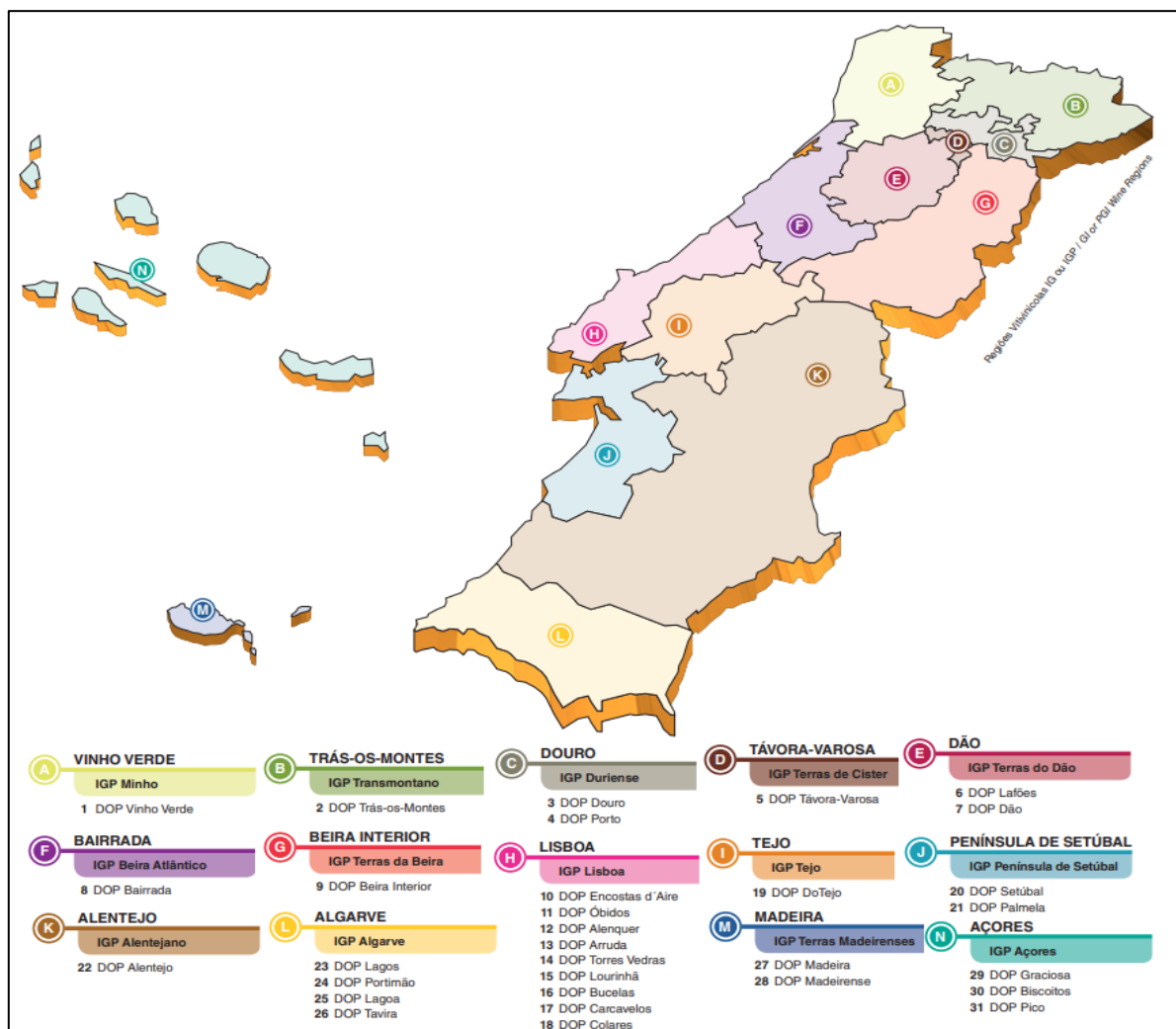


Figura 3: Regiões vitivinícolas de Portugal (Anuário 2022, IVV).

Cada região possui a sua própria Comissão Regional, escolhida entre os produtores de uvas e os fabricantes de vinhos (Mayson, 2003). Os IGP (Indicação Geográfica Protegida) são vinhos pertencentes a uma região específica, tal como os DOC, possuem regras para serem controlados, no entanto, não possuem Comissão Regional e podem ser produzidos com pelo menos 85% das uvas derivadas dessa região, podendo ser rotulados como “Vinho Regional”. Ainda existe a denominação “Vinho” ou “Vinho de mesa”, o qual não se encaixa nos primeiros parâmetros de classificação, embora também apresente exigências de qualidade que permitam a sua comercialização (IVV, 2022b).

A região do Dão (**Figura 4**), a qual também possui sua comissão denominada “Comissão Vitivinícola Regional do Dão” (C.V.R. Dão), é cortada pelos rios Dão, Mondego e Alva, é conhecida pelo seu potencial para produzir vinhos tintos de alta qualidade. O *terroir* do Dão caracterizado por solos graníticos e um clima continental com amplitudes térmicas

significativas, confere aos vinhos uma complexidade influenciada pelas serras que cercam a região, a serra da Estrela, Caramulo, Nave, Açor e Buçaco (Silva, 2008).

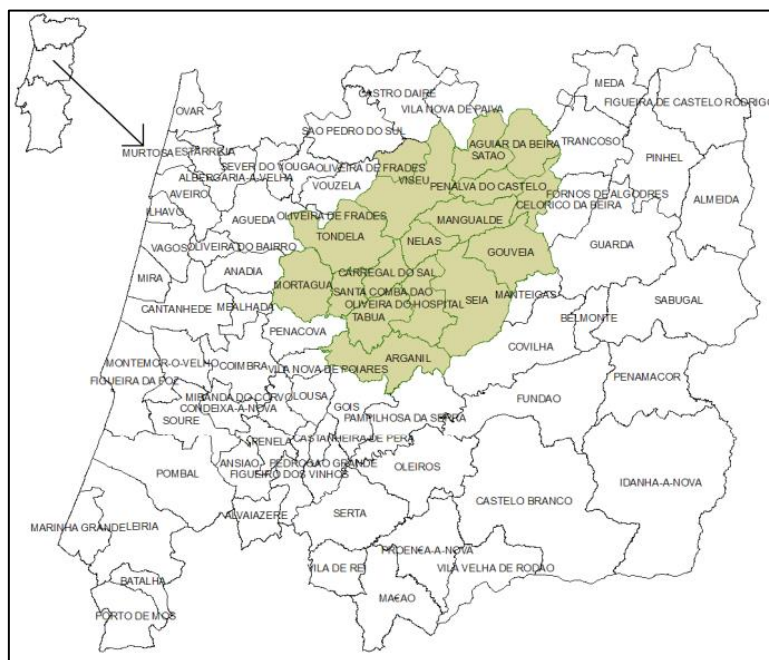


Figura 4: Região Demarcada do Dão (Silva, 2008).

Apesar dos desafios históricos enfrentados devido à estrutura socioeconômica complicada da região, como a filoxera e a intervenção do governo a partir de 1990, houve um renascimento na produção de vinhos de classe mundial. Com a liberdade das cooperativas e os investimentos de melhoria nas vinhas e adegas, a região do Dão tem vindo a ter um aumento na qualidade dos seus vinhos. Além disso, os vinhos brancos do Dão, especialmente os elaborados com a casta Encruzado, estão a ganhar reconhecimento pela sua qualidade excecional. Com as melhorias na produção e envelhecimento dos vinhos, o Dão está a consolidar a sua reputação como uma região produtora de vinhos de excelência (Mayson, 2003).

Ainda que as demarcações das regiões vitivinícolas tenham sido estabelecidas com a junção de Portugal à União Europeia, como citado anteriormente, em setembro de 1908, a região Demarcada do Dão foi formalmente estabelecida, sendo a primeira região de vinhos não licorosos regulamentada em Portugal (C.V.R. Dão, 2021).

Segundo os últimos levantamentos, as Terras do Dão apresentam uma produção declarada por região vitivinícola, em volume, num total de 280.000 hL (IVV, 2024). O tempo de estágio mínimo para vinhos de Denominação de Origem Protegida (DOP) nessa região é de

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

8 meses para tintos e 9 meses em garrafa para espumantes (IVV, 2022b). Relativamente às castas da região do Dão, existem as **castas tintas e brancas** (Figura 5).



Figura 5: Castas das uvas tintas e brancas da região do Dão, segundo o Anuário 2022 do Instituto da Vinha e do Vinho.

1.3 A empresa e a sustentabilidade

De acordo com a *World Conservation Union*, a sustentabilidade é definida como “a melhoria da qualidade de vida com as capacidades naturais dos ecossistemas” (Adams, 2019). Ban Ki-moon, Secretário-Geral das Nações Unidas, à data do lançamento dos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (Figura 6), afirmou que as empresas desempenham um papel crucial na realização desses objetivos. Ele apelou ainda à que avaliem os seus impactos, estabeleçam metas ambiciosas e comuniquem os resultados de forma transparente.

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.



Figura 6: 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (Ministério dos Negócios Estrangeiros, 2017).

A Global Wines S.A encontra-se em processo de certificação de acordo com o Referencial Nacional de Certificação de Sustentabilidade do Sector promovido pelo Instituto da Vinha e do Vinho - IVV, (IVV, 2022a) e tem procurado desenvolver uma abordagem sustentável que respeita o meio ambiente. Este compromisso é evidente na preservação das suas vinhas, mantendo as tradições vitivinícolas das regiões de produção, valorizando e incentivando os produtores locais. Assim, promove-se a economia circular e a economia local dos pequenos produtores das regiões do Dão, Bairrada e Alentejo, minimizando a pegada ecológica.

A empresa lançou-se também na produção e comercialização de vinhos biológicos, visando um nicho de mercado mais consciente das questões ambientais. Estes vinhos são produzidos a partir de uvas sem herbicidas sintéticos, pesticidas ou outros tratamentos químicos (DGADR, 2012). Exemplos destes produtos são o Cabriz Biológico Tinto e o Cabriz Biológico Branco (Global Wines S.A., 2024a), que seguem práticas de agricultura natural, priorizando o ambiente e a sustentabilidade.

Desde 2003, a empresa possui um Núcleo de Investigação Aplicada, dedicado ao desenvolvimento do sector vitivinícola e à otimização dos seus processos internos (Global Wines S.A., 2024a). Um dos principais desafios é garantir uma produção sustentável e uma

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

gestão eficiente dos resíduos, uma vez que o processo de produção de um vinho, gera uma quantidade significativa de resíduos e subprodutos (Sousa *et al.*, 2017).

Em 2023, a produção mundial de vinho ultrapassou os 240 milhões de hectolitros (hL), e Portugal contribuiu com aproximadamente 7,5 milhões de hL, dos quais mais de 90.000 hL foram de vinho espumante. De acordo com o IVV, os países europeus continuam a liderar a produção mundial de vinho, seguidos por alguns países da América que têm ganho destaque nos últimos anos. Portugal ocupa a 10^a posição e apresenta um crescimento constante da produção nos últimos cinco anos (IVV, 2024) (**figura 7**). Estes números evidenciam a importância de adotar uma necessidade de conduzir a produção sob princípios e valores mais sustentáveis ao nível do panorama social, económico e ambiental.

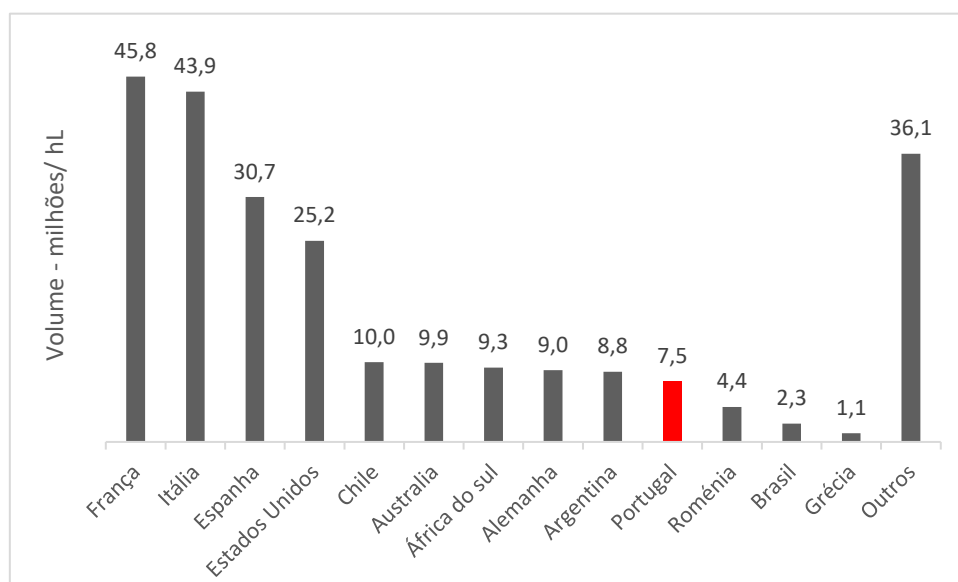


Figura 7: Produção mundial de vinho em 2023 em volume (milhões/ hL) – (adaptado de IVV, 2024).

A Global Wines S.A. produziu, em 2023, cerca de 388.670 garrafas de vinho espumante, o que corresponde a, aproximadamente, 505 kg de leveduras encapsuladas utilizadas (ProElif, Proenol). Em Portugal, muitas adegas utilizam as leveduras encapsuladas, tornando-se essencial o desenvolvimento de estratégias para reaproveitar as esferas de alginato de cálcio enquanto subproduto da etapa de *dégorgement* do vinho espumante. Neste contexto, e em colaboração com a Escola Superior Agrária de Coimbra, o Instituto Superior de Agronomia, a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e a Adega de Cantanhede, foi iniciado este trabalho preliminar focado no controlo da qualidade analítica e microbiológica de formulações de molho vinagrete constituídas por esferas de alginato de cálcio.

1.4 Objetivos do estágio

Este trabalho teve como objetivo principal adquirir conhecimentos sobre o controlo da qualidade dos vinhos, boas práticas laboratoriais, parâmetros analíticos e métodos laboratoriais (físico-químicos e microbiológicos). Em colaboração com a equipa de Enologia, pretendeu-se realizar análises diárias em concordância com o Plano de Controlo e Análise da empresa, abrangendo todos os processos produtivos do vinho.

Com base nas metodologias aplicadas diariamente no laboratório, foi também objetivo avaliar química e microbiologicamente vinagretes elaborados com esferas de alginato de cálcio, um subproduto da produção de vinhos espumantes, e compará-los com vinagretes comerciais. Assim, através de tal proposta, objetivou-se uma forma de contributo da empresa para a sustentabilidade e o meio ambiente.

2. O vinho

Segundo o Regulamento (CE) nº 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, classifica-se por vinho a “bebida produzida apenas por fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mostos de uvas”. Não deve possuir um teor alcoólico inferior a 8,5% vol. e superior a 15% vol. (exceto para os vinhos produzidos com denominação de origem protegida sem enriquecimento) (European Union, 2013).

Além do álcool etílico, água e glicerol, os componentes mais destacáveis nos vinhos, temos a presença de açúcares, ácidos orgânicos, sais minerais, compostos fenólicos, pigmentos, substâncias nitrogenadas, pectinas, compostos voláteis e aromáticos (ésteres, aldeídos e cetonas), vitaminas, anidrido sulfuroso, entre outros (Moraes & Locatelli, 2010).

Da classificação dos vinhos quanto ao seu tipo, temos os vinhos tranquilos (brancos, rosés e tintos), os espumantes e os fortificados, além do vinho verde (branco, rosé e tinto). Segundo a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), o processo de diferenciação dos mesmos, que é dado pela sua elaboração: enquanto os vinhos brancos podem ser produzidos a partir de uvas brancas ou tintas (sem maceração), os tintos utilizam apenas uvas tintas tintureiras. Já os rosés podem ser através de vinho tinto ou branco, dependendo do tempo de contacto com a película da uva no processo de vinificação (ASAE, 2016).

Dentro dos microrganismos envolvidos na fermentação do mosto de uvas, a *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada. Esta estirpe apresenta propriedades variadas e que podem influenciar na velocidade de fermentação e na quantidade de produtos formados secundariamente ao longo da fermentação alcoólica. Possui a capacidade de fermentar moléculas simples de açúcar e quando presente num ambiente com dissacarídeos, cresce mais lentamente. A sua utilização gera interesse pela produção de enzimas que degradam proteínas presentes no mosto e pelo seu potencial de fermentação do açúcar (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A *S. cerevisiae* atua preferencialmente em pH ligeiramente baixos e, em valores de pH demasiados baixos, torna-se inviável a sua ação. A sua curva de crescimento (**Figura 8**) divide-se em fase lag ou latência (baixo crescimento celular), fase log (multiplicação celular maior e mais rápida), fase estacionária (equilíbrio entre a multiplicação e morte das células) e a fase de declínio (níveis de morte celular superiores à multiplicação celular) (Held, 2010).

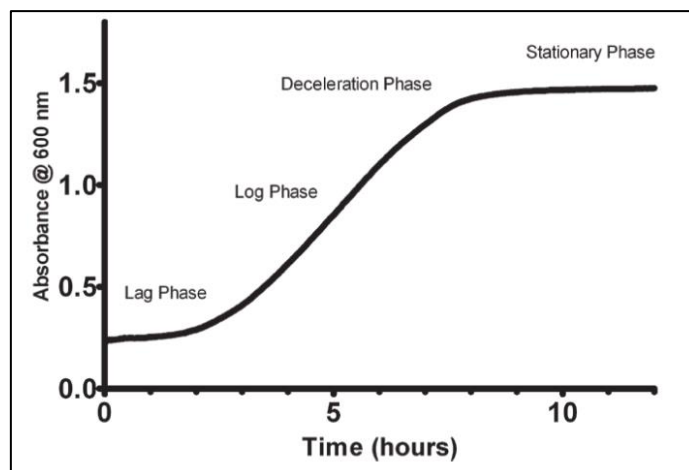


Figura 8: Curva de crescimento característica da *Saccharomyces cerevisiae* (Held, 2010).

Em condições de stress, utiliza a via de produção de glicerol, o qual age como um protetor para que a levedura não sofra morte celular e se mantenha íntegra. Estas leveduras são de grande interesse na indústria alimentar e, principalmente na produção de vinhos, uma vez que, em condições normais, influenciam o teor alcoólico final das bebidas e podem ser utilizadas na produção do gás carbónico desejado nos vinhos espumantes (Morais *et al.*, 2014).

2.1 Produção de vinhos tranquilos

Os vinhos tranquilos passam por diversos processos até ao seu engarrafamento (**Figura 9**). A primeira etapa de qualquer vinho é a vindima e em todos os processos de produção as uvas utilizadas influenciarão diretamente o sabor, a cor e até mesmo a sensação de boca de cada vinho. Um vinho tinto utiliza uvas mais escuras e mais espessas, que resultam num sabor mais encorpado e complexo. Já para a elaboração de um vinho branco, recorre-se a uvas de polpa mais clara, resultando num sabor mais leve e fresco. Durante o processo de produção, no caso de um vinho tinto, após a colheita das uvas, a película da uva permanece em contato com o mosto durante a fermentação. Esse contato prolongado é o responsável pela cor intensa do vinho tinto. No caso do vinho branco, a casca é removida antes da fermentação alcoólica, resultando num vinho com tonalidade mais clara e menos encorpada (Pinto, 2022). A cor de um vinho rosé é alcançada através do contacto da película das uvas tintas com o mosto. Os pigmentos da casta da uva dão a cor a um vinho rosé e o tempo de maceração ou a intensidade da prensagem determina a cor mais ou menos rosada.

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

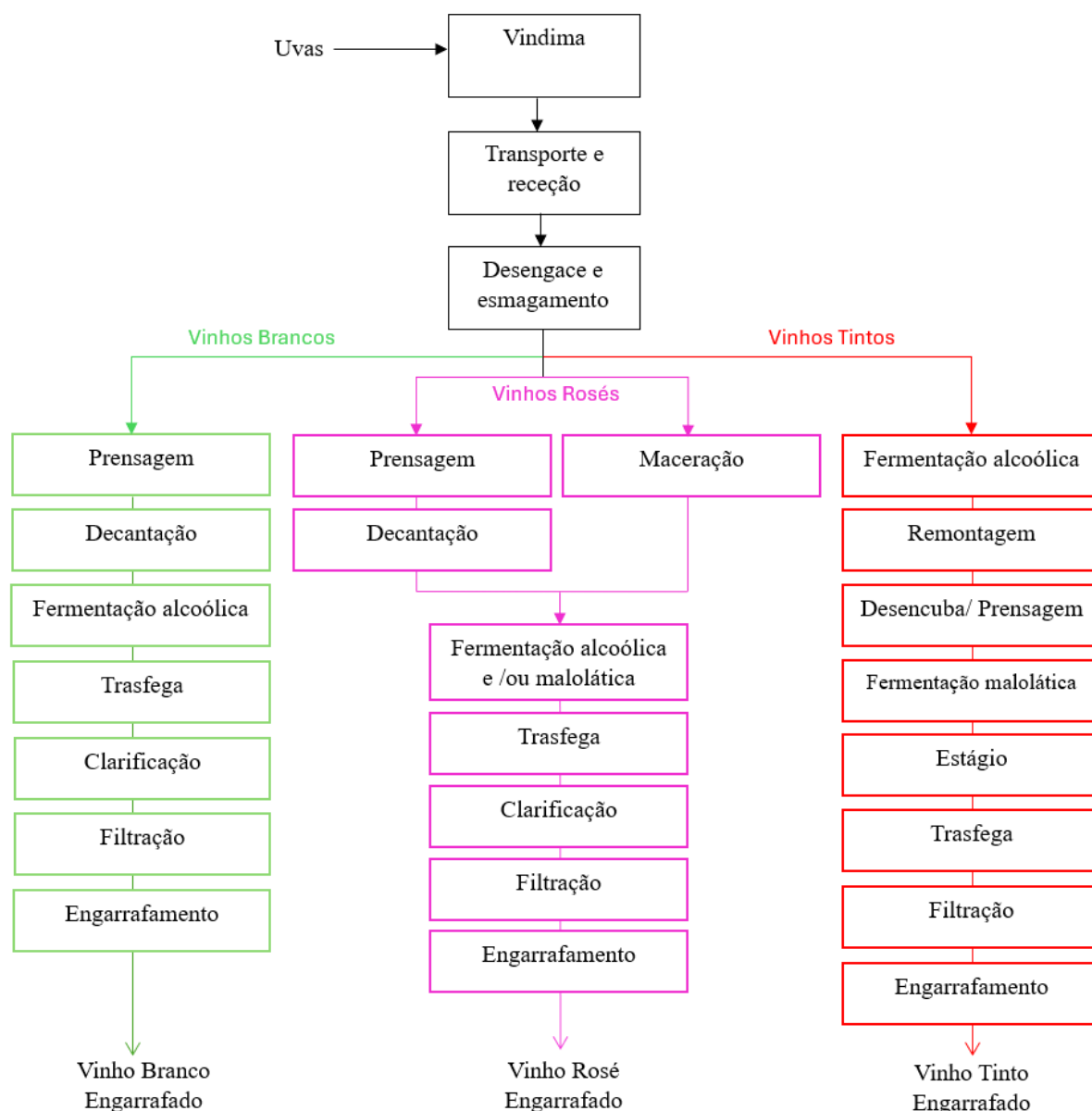


Figura 9: Fluxograma genérico de produção de vinhos tranquilos (brancos, rosés e tintos) - (adaptado de Cardoso, 2019).

2.2 Produção de vinhos espumantes

Segundo o Regulamento (UE) nº 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, o vinho espumante é “o produto obtido pela primeira ou segunda fermentação alcoólica de uvas frescas, mosto de uvas ou vinhos; que liberta quando se procede à abertura do recipiente, dióxido de carbono proveniente exclusivamente da fermentação; quando conservado à temperatura de 20 °C em recipientes fechados, apresenta uma sobrepressão, devida ao dióxido de carbono em solução, não inferior a 3 bar”; e é preparado a partir de vinho de base cujo título

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

alcoométrico total não seja inferior a 8,5% vol. No caso de vinhos espumantes de qualidade, o vinho base não pode ultrapassar os 9% vol., dado o seu efeito negativo no crescimento das leveduras (European Union, 2013) (Cardoso, 2019).

No processo de produção de um vinho espumante ocorrem duas fermentações: uma primeira para obtenção do vinho base (fermentação alcoólica) e uma segunda fermentação para a formação de CO₂ que, como mencionado anteriormente, caracteriza um vinho espumante. Os diferentes métodos que existem para a produção de vinho espumante apenas diferem na forma como se realiza a segunda fermentação. O método tradicional, clássico ou champanhês, o qual há uma segunda fermentação em garrafa, o método de cuba fechada (ou *Charmat*), onde a segunda fermentação ocorre em recipientes de grandes dimensões com aquecimentos e arrefecimentos como meio de estabilização pelo frio e, por fim, o método de transferência ou contínuo, caracterizado pela segunda fermentação em recipientes grandes e ligados entre si, de forma contínua, onde o vinho não permanece por menos de 18 dias e onde a fermentação ocorre sob pressão constante (Caliari *et al.*, 2013). Na Global Wines S.A., utiliza-se o método clássico.

Na produção de um vinho espumante (**Figura 10**), à semelhança de um vinho tranquilo, procede-se à produção de um vinho (rosé ou branco): vindima, desengace/esmagamento, prensagem, clarificação, fermentação alcoólica e/ou malolática, estabilização e filtração, engarrafamento e adição do licor de tiragem, seguido de estágio com a segunda fermentação (entrada das leveduras encapsuladas), saída das borras (juntamente com as leveduras encapsuladas), adição do licor de expedição no *dégorgement*, rolhagem e rotulagem.

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

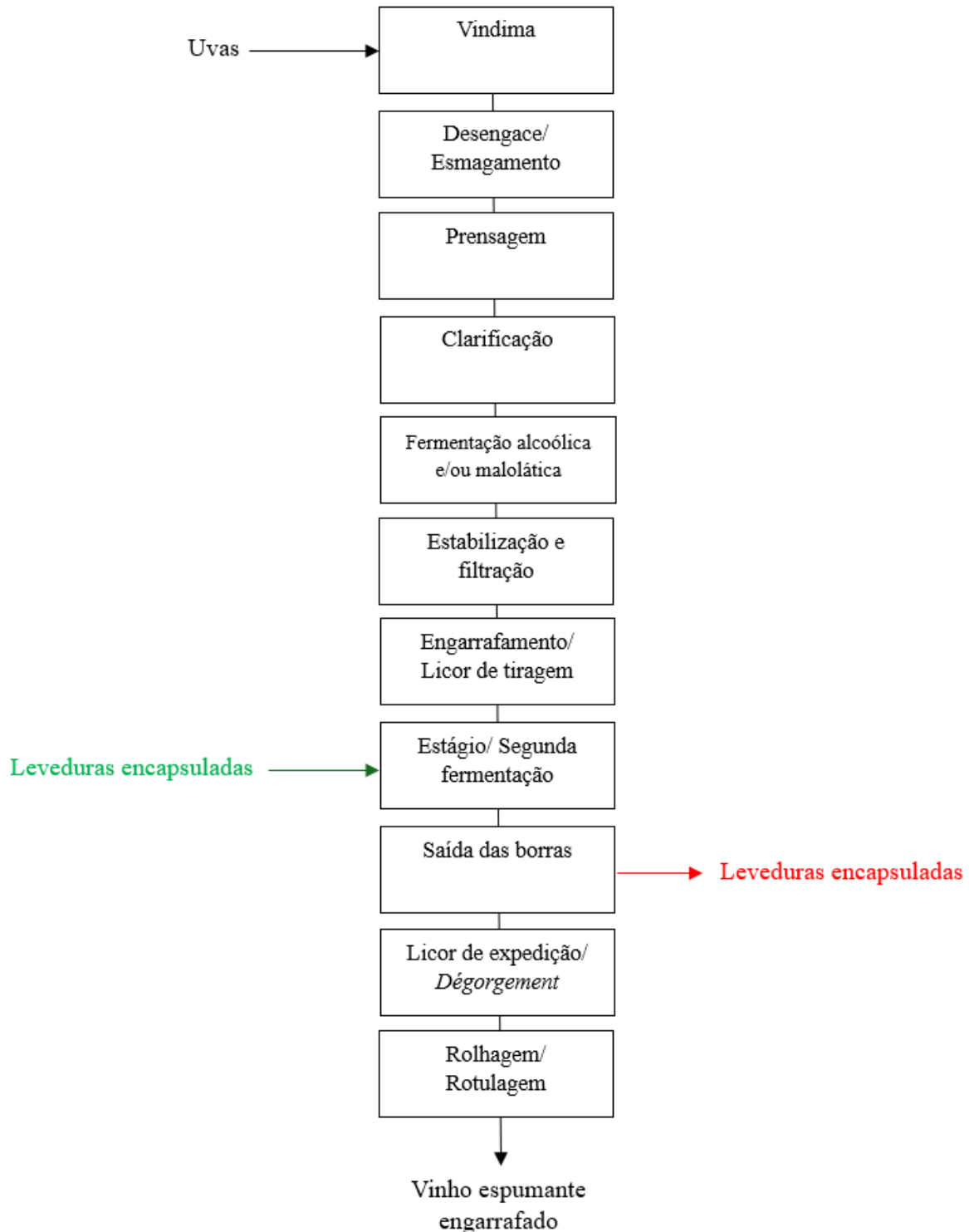


Figura 10: Fluxograma genérico da produção de vinho espumante pelo método clássico (adaptado de Guedes, 2021).

A vindima deve ser precedida por um rigoroso controlo de maturação durante o qual se analisam parâmetros como o teor alcoólico provável, acidez total e pH. O teor alcoólico provável deverá situar-se entre 10% vol. e 11% vol., uma vez que o vinho base sofrerá uma

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

outra fermentação que cresce em cerca de 1,2% vol. a 1,5% vol. o grau alcoólico. A acidez total deve ter entre 7 e 9 g/L e o pH não deverá ser superior a 3,20 para garantir as condições ideais para o estágio sobre borras, uma vez que, na segunda fermentação o vinho perde acidez. É, ainda, importante, assegurar que as uvas estão isentas de *Botrytis cinerea*, um fungo que afeta a qualidade da espuma e perdas ao nível do aroma e alterações na cor do vinho devido ao fenómeno de acastanhamento (Nicolau, 2011).

O desengace consiste na separação do engaço do mosto, grainhas e películas e o esmagamento diz respeito ao rebentamento dos bagos para libertação da polpa. A prensagem tem como objetivo a separação do mosto das partes sólidas (engaço, películas, grainhas) e deverá ser o mais suave possível para evitar a extração de proteínas e da enzima polifenol oxidase responsável pela oxidação dos compostos fenólicos que provoca o escurecimento dos vinhos (Cardoso, 2019). Após a extração do mosto, é necessário a clarificação, para retirada de sedimentos e resíduos sólidos que possam existir no mosto a fermentar, uma vez que os mesmos originam em consequência, um vinho com aromas pouco elegantes. Para isto, existem vários métodos de clarificação: sedimentação, centrifugação, flotação e filtração (Guedes, 2021).

Segue-se a fermentação alcoólica, processo pelo qual as leveduras metabolizam a glucose ($C_6H_{12}O_6$) e a frutose ($C_6H_{12}O_6$) presente nas uvas, formando o piruvato que é convertido em etanol (C_2H_5OH), com libertação de dióxido de carbono (CO_2) (**Figura 11**). Durante a fermentação malolática ocorre a metabolização de ácido L-málico em ácido L-lático por enzimas de bactérias lácticas dos géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Oenococcus* (Curvelo-Garcia & Barros, 2015).

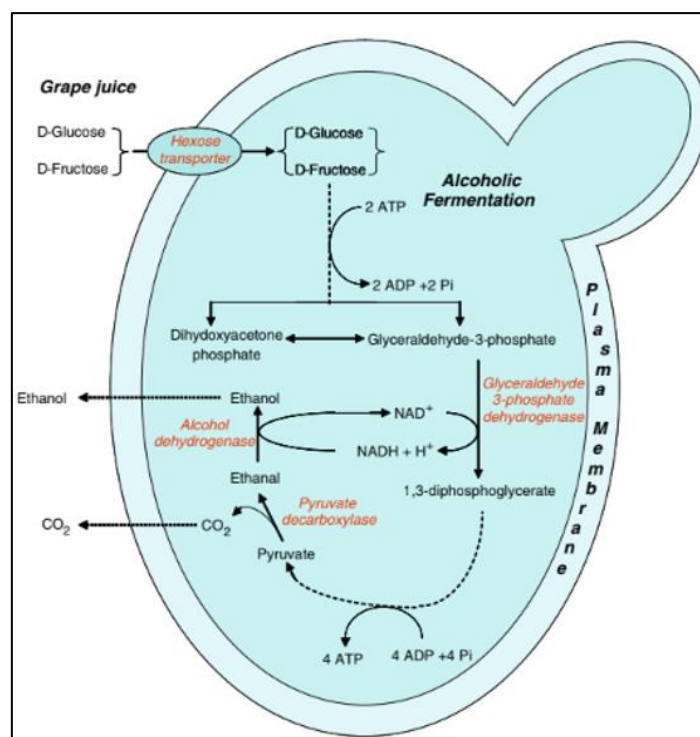


Figura 11: Fermentação alcoólica (Zamora, 2009).

A estabilidade de um vinho diz sobre a capacidade deste se manter límpido ao longo do tempo e a instabilidade, sobre a turbidez, que pode resultar da instabilidade proteica e/ou da instabilidade tartárica. A primeira ocorre da precipitação de proteínas presentes nas uvas e denomina-se casse proteica. Já a instabilidade tartárica é proveniente da precipitação de sais de bitartarato de potássio e/ou tartarato neutro de cálcio (Guedes, 2021).

Após o processo de obtenção do vinho base espumante, é necessário que ele sofra uma segunda fermentação que, no método clássico, ocorre dentro da garrafa. Para isto é necessário um licor de tiragem que será utilizado no engarrafamento, seguido de estágio, remuagem, *dégorgement*, atesto, rolhagem e rotulagem. As características do licor de tiragem são definidas em função das características finais pretendidas. No entanto, na sua composição deve conter, invariavelmente, açúcar (sacarose) que é metabolizado pelas leveduras com a produção de etanol e dióxido de carbono. Contém, também, aditivos para estimular o crescimento das leveduras (sendo os mais comuns os sais de amónia e a tiamina) e um adjuvante (como por exemplo a bentonite) para facilitar a deposição das leveduras durante a remuagem, no caso de serem utilizadas leveduras livres. Uma alternativa às leveduras livres são as leveduras imobilizadas/encapsuladas, que neste caso dispensam a etapa da remuagem (Guedes, 2021).

Antes do engarrafamento, é importante filtrar o vinho, para melhorar a sua limpidez, eliminar microrganismos e prosseguir com o engarrafamento onde são adicionadas as leveduras de forma automática a cada uma das garrafas. Após o enchimento, a garrafa é fechada com um obturador e uma cápsula temporária. O tempo de fermentação é de, aproximadamente, um mês, variando em função da temperatura (temperaturas mais altas aceleram o processo e temperaturas mais baixas retardam). O ideal é manter um intervalo entre os 10 °C e 20 °C. Durante o estágio sobre as leveduras, ocorre a autólise, que se caracteriza pela morte de células e libertação de componentes citoplasmáticos e da parede celular devido à ação de enzimas hidrolíticas, enriquecendo o vinho a nível sensorial. As borras acumuladas no gargalo, resultado das leveduras sedimentadas da segunda fermentação em garrafa, são eliminadas na descapsulação das garrafas na fase de *dégorgement*. O licor de expedição trata-se de um *blend* elaborado pelos enólogos, que determina as características do produto final, corrige o volume das garrafas e permite definir a classificação de açúcares de um vinho espumante podendo ainda ajudar a definir a cor de um vinho espumante (**Figura 12**) (Guedes, 2021).



Figura 12: Classificação de açúcares nos vinhos espumantes em Portugal (Reg. (CE) nº 607/2009).

O engarrafamento de um vinho espumante termina com a colocação de uma rolha de cortiça característica de espumante um *muselet* devido à sobrepressão da garrafa e colocação da respetiva rotulagem.

2.2.1 Leveduras encapsuladas na produção de vinhos espumantes

A imobilização celular diz respeito ao confinamento das células sem alterar a atividade desejada, permitindo poder trabalhar com densidades maiores e melhor eficiência nos processos. Algumas das matrizes para a imobilização são o alginato (polissacarídeo proveniente

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

de algas marrons), quitosana, álcool polivinílico entre outras. Dessa forma, pode-se ainda eliminar algumas etapas do processo como o isolamento, a filtração e ainda a remoção de microrganismos. Dentro das formas de imobilização, considera-se a interação entre a matriz e o agente imobilizante, podendo existir interações via ligações iónicas, covalentes ou de adsorção em superfície, sendo a imobilização por ligações covalentes a mais estável e mais forte. Ainda podem ser encapsuladas em membranas, matriz porosa ou por floculação (Kovaleski *et al.*, 2020). O método de encapsulação por matriz porosa dá-se através de uma solução de alginato de sódio e uma suspensão celular, que irão gotejar em cloreto de cálcio, formando as esferas de alginato de cálcio (Portugal *et al.*, 2003). Esta forma de encapsulamento é comumente a mais utilizada no processo de tiragem de espumantes, com maior acessibilidade, menor custo e menor toxicidade (Gonçalves & Rodrigues, 2020).

A utilização das leveduras encapsuladas na produção de vinhos espumantes permite que o vinho se mantenha sempre límpido, eliminando assim a necessidade de adjuvantes no processo. Estas esferas não comprometem a permeabilidade, permitindo a entrada de açúcar e de nutrientes para que as leveduras continuem o seu processo metabólico, enriquecendo o vinho (Proenol - ProElif, 2024).

O encapsulamento beneficia as empresas ao reduzir a necessidade de mão-de-obra, eliminando a etapa de remuagem e a preparação do inóculo, e, principalmente, proporcionando mais espaço na cave ao dispensar movimentações desnecessárias. Sensorialmente, os vinhos espumantes que utilizam as leveduras encapsuladas em alginato de cálcio podem apresentar, na sua maioria, maior complexidade de aromas e um melhor aspeto em termos de estabilidade da espuma, limpidez e bolhas (Costeira, 2021).

2.3 A microbiologia dos vinhos e microrganismos de alteração

Relativamente à microbiologia dos vinhos, pode ocorrer alterações pela presença de fungos filamentosos (os quais produzem metabólitos que interferem no crescimento das leveduras ao longo da fermentação alcoólica e são capazes de se desenvolver em superfícies como madeira ou rolhas), bactérias lácticas, acéticas ou de certas leveduras. É de extrema importância monitorizar todos estes microrganismos (**Tabela 1**) ao longo da cadeia produtiva de um vinho, uma vez que podem alterar o produto final. A presença de fungos filamentosos pode ter uma proliferação descontrolada antes da vindima ocasionando podridões. As bactérias

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

acéticas podem ser detetadas em ambientes ricos em açúcar e com acidez mais elevada. As bactérias lácticas são importantes e de interesse nesse tipo de indústria, uma vez que na fermentação malolática são responsáveis pela redução da acidez total em vinhos tintos jovens e proporcionam também maior estabilidade e melhores aromas e sabores (Nicolau, 2011). Algumas espécies de leveduras dos géneros *Candida*, *Hansenula* e *Pichia* podem estar presentes durante o envelhecimento dos vinhos com a presença de oxigénio formando um filme sobre o mesmo e deteriorando-o (chamadas “leveduras de véu”) (Nicolau, 2011).

Tabela 1: Microrganismos que podem causar alterações no vinho (Nicolau, 2011).

Fungos Filamentosos	Bactérias Acéticas	Leveduras
<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Acetobacter</i> spp.	<i>Kloeckera apiculata</i> spp.
<i>Botrytis</i> spp.	<i>Acidomonas</i> spp.	<i>Candida</i> spp.
<i>Penicillium</i> spp.	<i>Gluconobacter</i> spp.	<i>Cryptococcus</i> spp.
<i>Phytophthora</i> spp.	<i>Gluconoacetobacter</i> spp.	<i>Debaryomyces</i> spp.
<i>Moniliella</i> spp.	<i>Gluconacetobacter</i> spp.	<i>Hansenula</i> spp.
<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Hansenii</i> spp.	<i>Issatchenkia</i> spp.
<i>Alternaria</i> spp.		<i>Kluyveromyces</i> spp.
<i>Geosmithia</i> spp.		<i>Pichia metschnikowia</i> spp.
<i>Verticillium</i> spp.		<i>Rhodotorula</i> spp.
		<i>Dekkera</i> spp.
		<i>Brettanomyces</i> spp.

As leveduras podem ser nativas ou indígenas, isto é, já coabitantes desde a vinha e adegas, ou selvagens e estas entram em competição com as LSA (leveduras secas ativas, enologicamente inoculadas no vinho para promover a fermentação alcoólica). Ainda que a *Saccharomyces cerevisiae* seja uma levedura benéfica, há a necessidade de monitorizar frequentemente as condições de higienização da adega para evitar o aparecimento de contaminações microbiológicas.

A *Dekkera* spp. ou *Brettanomyces* spp. (forma esporulada e forma não esporulada, respetivamente), é a levedura mais prejudicial em ambiente de adega. É uma levedura proveniente da vinha e o seu crescimento é influenciado por processos de higienização ineficientes, condições de humidade elevada, podendo ser encontrada em vinhos em estágio em

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

madeira pela maior disponibilidade de nutrientes (as barricas de madeira mais velhas são mais favoráveis ao desenvolvimento dessa levedura devido à baixa porosidade) e apresenta ainda resistência elevada ao dióxido de enxofre, utilizado na proteção do vinho em adega. A *Brettanomyces* spp. desenvolve uma enzima chamada beta-galactosidase e que degrada o dissacarídeo celobiose produzindo glucose. As borras e os precipitados de tartarato dentro das barricas podem formar uma barreira que influencia no seu desenvolvimento e daí a grande importância de uma boa higienização em adega. O carácter “Brett” dos vinhos é a designação utilizada para descrever o defeito aromático que alguns vinhos adquirem devido ao aparecimento de fenóis voláteis durante a produção e mesmo após o engarrafamento e que conferem um aroma desagradável descrito como aroma a suor a cavalo, fenólico ou a medicamento (Nicolau, 2011).

2.4 O vinagre e o vinho

Segundo o Decreto – Lei nº 174/2007 de 8 de maio, do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, o vinagre é um produto obtido unicamente a partir do processo biológico por dupla fermentação – alcoólica e acética – de origem agrícola. Existem diversos tipos de vinagres como os provenientes de vinhos, de frutas e bagas, de sidra, de álcool, de cereais, de malte, entre outros (Ministério da agricultura do desenvolvimento rural e das pescas, 2007).

Por "vinagre de vinho" entende-se o produto obtido exclusivamente por fermentação acética do vinho. A microbiota existente no vinagre é na sua maioria bactérias acéticas, aeróbias estritas. Apesar da sua utilização para oxidar o álcool em ácido acético, é preciso tomar atenção para que a reação não continue a oxidar ácido acético em gás carbónico e água, podendo contribuir com a deterioração do alimento em questão (Dias, 2017).

A partir do vinagre, podemos confeccionar outros produtos alimentares como os vinagretes, que são resultado de uma emulsão fria da combinação de vinagre e/ou outro ácido, óleo, água e outros ingredientes (Laranjeira *et al.*, 2013).

Emulsões frias são formadas pela combinação mecânica de dois ou mais líquidos que, originalmente, não se misturariam. Neste processo, as partículas de gordura são quebradas, permitindo a sua integração ao outro líquido. Dependendo da estabilidade desta combinação,

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

as emulsões podem ser classificadas como temporárias (vinagretes), semipermanentes (geralmente servidas quente) e permanentes (maioneses) (Estevão, 2019).

A constituição de um vinagrete corresponde a uma proporção genérica de 3 partes de óleo (como azeite, óleo de soja ou outros tipos) para 1 parte de ácido (como vinagres de vinho, vinagre de frutas e suco de limão) e o restante composto por ingredientes aromatizantes (como mostarda, cebolinho e ervas, entre outros). Apesar de a sua composição ser maioritariamente óleo, a designação do vinagrete é geralmente dada pelo tipo de ácido ou condimento principal utilizado (Estevão, 2019).

Geralmente, a preparação dos vinagretes inicia-se com a receção e pesagem dos ingredientes, seguida pela elaboração da mistura, emulsificação e armazenamento em frascos esterilizados (Guiné, 2016). Para este estudo, foram adicionalmente preparadas infusões aromáticas para intensificar o sabor e introduzidas esferas de alginato de cálcio no final da preparação, de acordo com a **figura 13**. A todas as formulações foram adicionadas 4 g de esferas de alginato de cálcio/100 mL com o intuito de promover texturas diferentes e melhorar as características de palatabilidade.

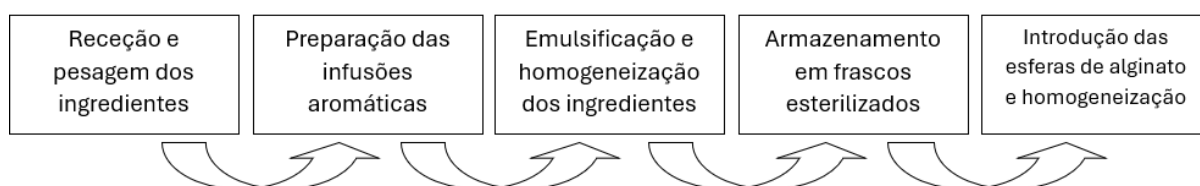


Figura 13: Esquema genérico de preparação de vinagretes.

3. Amostragem e Metodologia

3.1 Amostragem no controlo da qualidade dos vinhos

A amostragem necessária para a realização de todas as análises foi realizada conforme o plano de amostragem definido no Plano de Controlo e Análise (PCA) (Global Wines S.A., 2024d). O PCA abrange a monitorização ao longo de todas as etapas do processo, desde a uva até a garrafa, incluindo a frequência das análises, os parâmetros analíticos, as responsabilidades, as ações corretivas e os documentos de registo.

As análises diárias incluem o transporte de vinho entre adegas internas, a compra de vinho, a monitorização analítica do granel próprio armazenado em barricas e depósitos, a certificação de vinho, o controlo do processo de higienização e o acompanhamento do engarrafamento. A importância do laboratório é evidente nas análises físico-químicas e microbiológicas realizadas, garantindo a qualidade de todos os processos e a conformidade face à legislação em vigor.

3.2 Metodologia no controlo da qualidade dos vinhos

3.2.1 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas, para além de contribuem para a formação de uma primeira impressão geral dos vinhos, reportam aspetos importantes (cor, estrutura e qualidade) e possíveis alterações causadas por agentes microbiológicos ou pela utilização de práticas e de produtos enológicos inadequados.

Alguns dos parâmetros analíticos na matriz vinho são: teor alcoólico volumétrico (TAV), acidez volátil (AV), acidez total (AT), massa volúmica (MV), extrato seco total (ES), pH, açúcares redutores (AR) e sulfuroso livre e total.

A metodologia oficial utilizada para a realização destes parâmetros é baseada nos métodos de análises da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV). Contudo, no laboratório da Global Wines S.A., as análises podem ser também executadas recorrendo a métodos instrumentais como a espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

A espectroscopia infravermelha (IR) baseia-se no princípio de que a maioria das moléculas absorvem luz na região infravermelha do espectro eletromagnético, convertendo-a numa vibração molecular. Esta absorção é característica da natureza das ligações químicas presentes na amostra e é medida em função do comprimento de onda. A luz passa através de um interferómetro, é direcionada para a amostra e o resultado surge como um espectro que pode ser utilizado para identificar amostras orgânicas e inorgânicas (Leite, 2008). Através da integração dos espectros por Transformada de Fourier e recorrendo a uma reta de calibração definida com vinho padrão, é possível determinar com exatidão a concentração dos vários compostos que caracterizam o vinho, obtendo através de uma única metodologia, todos os parâmetros físico-químicos que qualificam este produto.

3.2.1.1 Teor Alcoólico Volumétrico (OIV-MA-AS312-01)

O método oficial recorre a destilação, determinando o álcool contido numa amostra de vinho que é neutralizada para evitar a passagem dos ácidos voláteis (carbónico, sulfuroso e acético) ao destilado. Pela incorporação de água desionizada, faz-se chegar ao mesmo volume de amostra e determina-se o grau alcoólico da solução hidroalcoólica por areometria (alcoholómetro). Considera-se vinho um resultado de TAV $\geq$ 9% Vol.

3.2.1.2 Acidez Volátil (OIV-MA-AS313-02)

É determinada pela titulação do destilado dos ácidos gordos pertencentes à série acética, fazendo-se a correção do dióxido de enxofre, uma vez que a acidez deste também é destilada. No chapinador do Cazenave-Ferré é colocado 10 mL do vinho, este é colocado no Erlenmeyer que contém 250 mL de água desionizada. Coloca-se no topo do chapinador um gerador de vapor, liga-se a manta de aquecimento e após começar a ferver, coloca-se o taco no chapinador e liga-se a água para arrefecer o destilado. A destilação ocorre por arrastamento de vapor de água, seguida da retificação e condensação.

Após 100 mL de destilado obtido, desliga-se a manta de aquecimento, retira-se o taco e o gerador de vapor. O destilado está pronto a ser titulado, sendo a primeira titulação referente à acidez volátil e a segunda ao sulfuroso livre. Na primeira titulação o indicador utilizado é a fenolftaleína, 4/5 gotas, e é titulado com NaOH de 0,1 M. A segunda titulação, para correção do sulfuroso, é feita com o mesmo destilado, e sendo acidificado o meio com ácido sulfúrico a $\frac{1}{4}$, e o indicador é o cozimento de amido (2 mL), sendo titulado com iodo de 0,03125N.

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

Para o processamento de resultados, é necessário registar os volumes gastos de cada titulante e estes são processados em Excel dando assim a Acidez Volátil Corrigida (AVC), expressa em g H₂SO₄/L. O limite legal deste parâmetro para os vinhos brancos e rosés é $\leq 1,08$ g/L e para os vinhos tintos é $\leq 1,2$ g/L.

3.2.1.3 Acidez Total (OIV-MA-AS313-01)

É determinada por titulação dos ácidos tituláveis que com a adição de uma solução alcalina se eleva o pH do vinho a 7,00. Sendo então determinada a soma de todos os ácidos orgânicos e inorgânicos e quer estejam no estado livre ou combinado.

Num Erlenmeyer são colocados 10 mL de amostra, a este adiciona-se 30 mL de água desionizada e 1 mL indicador de Azul de Bromotimol, ficando assim a solução com uma cor de tijolo. O titulante é o NaOH de 0,1 M, este é adicionado à solução até que a cor desta mude para um azul-esverdeado, sendo este o ponto de equivalência e dando término à titulação. O resultado é determinado através do volume gasto de titulante (V), expressando-se o resultado em g/L de ácido tartárico ($AT=V \times 0,75$). O limite mínimo legal deste parâmetro é $\geq 3,5$ g/L de ácido tartárico.

3.2.1.4 Massa Volúmica (OIV-MA-AS2-01) e Extrato Seco Total (OIV-MA-AS2-03B)

Massa Volúmica é o quociente entre a massa de um determinado volume de vinho ou mosto a 20° C e esse volume. O extrato seco total é o conjunto de todas as substâncias que não se volatilizam, em condições físicas tais que, os componentes desse extrato sofram o mínimo de alteração.

A MV determina-se por areometria, introduzindo aproximadamente 250 mL de vinho numa proveta, mede-se a temperatura com um termómetro calibrado e regista-se, retira-se o termómetro e coloca-se o areómetro em rotação e de modo a não bater no fundo da proveta, e a leitura deste faz-se por cima do menisco e quando o areómetro estiver estabilizado.

O extrato seco total determina-se após a análise de Teor Alcoólico Volumétrico, Acidez Volátil e Massa Volúmica. Os resultados são processados através de uma Tabela de Excel em que é pedido MV expressa em g/ mL, T° C (° C), AVC (g/L) e TAV, dando os resultados de MV corrigida a 20° C, T° C corrigida e Extrato Seco Total expresso em g/L.

3.2.1.5 pH (OIV-MA-AS313-15)

O pH é determinado por potenciometria pela diferença de potencial que se estabelece entre dois eléctrodos de natureza diferente, mergulhados no meio: um eléctrodo tem um potencial ligado ao pH do meio, o outro eléctrodo tem um potencial fixo e conhecido. O pH é uma escala numérica adimensional utilizada para especificar a acidez ou basicidade de uma solução aquosa, de acordo com o descrito no Regulamento (CEE) N° 2676/90, (Comissão das Comunidades Europeias, 1990).

3.2.1.6 Açúcares Redutores (OIV-AS311-01B)

Segundo o OIV entende-se por açúcares redutores o conjunto de açúcares com função aldeica e cetónica que lhes confere o poder redutor sobre uma solução cupro-alcalina. Os valores apresentados, ajudam somente a definir a tipicidade do vinho, em doce ou seco (bruto), dependendo da quantidade de açúcares existentes nas amostras. Na Global Wines S.A, recorre-se a um analisador enzimático (Y15, Biosystems) para determinação deste parâmetro.

3.2.1.7 Dióxido de Enxofre Livre e Total (adaptado de OIV-MA-AS323-04B)

O sulfuroso (SO_2) é determinado pela oxidação com uma solução titulada de iodo, na presença de cozimento de amido. Este parâmetro é o primeiro a ser analisado numa amostra, pois é altamente volátil. O SO_2 Livre (SO_2L) é titulado após a acidificação do meio, já o SO_2 Total (SO_2T) primeiramente é necessário hidrolisar o SO_2 combinado em meio alcalino e, posteriormente procede-se igual ao Livre.

Para determinar o SO_2L , num Erlenmeyer colocam-se 50 mL de amostra, adiciona-se 5 mL de ácido sulfúrico e 2 mL de cozimento de amido. Titula-se com uma solução de Iodo de 0,03125 N até que a amostra apresente uma cor roxa que permaneça durante 5 segundos. Para o SO_2T , é utilizada a mesma técnica, sendo que é adicionado primeiramente 20 mL de Hidróxido de Potássio (KOH) de 0,1 M, deixando reagir durante 15 minutos. Depois, adiciona-se 10 mL de ácido sulfúrico e cozimento de amido, procedendo de acordo com o descrito anteriormente. O cálculo usado para as duas titulações é $\text{SO}_2 = \text{Volume} \times 20 \text{ (mg/L)}$.

O SO_2 é considerado um alergénio pela legislação europeia (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2011), que exige a rotulagem nos alimentos, estando legislados os limites máximos da sua aplicação, segundo a **Tabela 2**.

Tabela 2: Concentrações limites legais de SO₂ nos vinhos (Comissão Europeia, 2019).

Vinhos Tranquilos com <5 g/L de açúcares (Glucose + Frutose)	Vinhos Tintos	SO ₂ <150 mg/L
	Vinhos Brancos e Rosés	SO ₂ <200 mg/L
Vinhos Tranquilos com >5 g/L de açúcares (Glucose + Frutose)	Vinhos Tintos	SO ₂ <200 mg/L
	Vinhos Brancos e Rosés	SO ₂ <250 mg/L
Vinhos Biológicos	Vinhos Tintos	SO ₂ <100 mg/L
	Vinhos Brancos e Rosés	SO ₂ <150 mg/L
Outros vinhos	Vinhos Licorosos	SO ₂ <150 mg/L
	Vinhos Espumantes	SO ₂ <185 mg/L
	Vinhos Colheita Tardia	SO ₂ <400 mg/L

3.2.2 Análises microbiológicas

O método de filtração por membrana para pesquisa de microrganismos viáveis é o método implementado e tem como objetivo quantificar microrganismos aeróbios (leveduras e bolores). Baseia-se na filtração do vinho, utilizando vácuo, através de uma membrana com porosidade específica (0,45 µm), que retém os microrganismos na sua superfície. A membrana é posteriormente inoculada numa caixa de Petri contendo meio de cultura e, por capilaridade, difunde para a membrana entrando em contacto com os microrganismos. Após incubação com tempo e temperaturas específicos para cada tipo de microrganismo de interesse, procede-se a contagem das colónias que podem estar presentes e expressa-se em Unidades Formadoras de Colónias (UFC) por 100 mL de solução.

Este procedimento exige condições de assepsia na manipulação do material e equipamentos e a manipulação ocorre sempre no interior de uma câmara de fluxo laminar, devidamente desinfetada com recurso de uma luz ultravioleta e encontra-se descrito nos Métodos Internos da empresa (Global Wines S.A., 2024c).

Na Global Wines S.A., recorre-se a dois meios de cultura, tendo em conta o tipo de microrganismos:

i) bolores e leveduras, usa-se o meio de cultura Agar Nutriente WLN, com o tempo de incubação dos microrganismos a 35 ± 2°C entre 18 - 48 horas (Condalab, 2019a) – **Anexo A**.

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

ii) *Brettanomyces* spp., usa-se o meio de cultura *Brettanomyces* Agar, com o tempo de incubação dos microrganismos a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias (Condalab, 2019b) – **Anexo B**.

Atualmente, não existem limites legais estabelecidos para os parâmetros microbiológicos em vinhos. Contudo, o PCA da Global Wines S. A. define o limite para quantificação de bolores e leveduras $<100 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$ no caso de vinhos tranquilos com $\leq 4 \text{ g/L}$ de teor de açúcares redutores e $<50 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$ para vinhos tranquilos com $\geq 4 \text{ g/L}$ de teor de açúcares redutores.

3.3 Amostragem no controlo da qualidade de vinagretes

A amostragem para este trabalho abrangeu um total de seis amostras de vinagrete elaboradas, identificadas como: 463, 501, V1, V2, V3 e V4.

As seis amostras apresentam diferentes composições, de acordo com a **Tabela 3**. O conceito gastronómico em que se baseiam não é apresentado neste trabalho uma vez que será descrito em trabalho subsequente a ser apresentado no âmbito da tese de mestrado em Ciências Gastronómicas do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, em fase de desenvolvimento.

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

Tabela 3: Composição das diferentes amostras de vinagretes elaboradas.

Ingredientes	463	501	V1	V2	V3	V4
Água	x	x	x	x	x	x
Óleo de girassol	x	x	x	x	x	x
Vinagre de vinho branco	x	x				
Vinagre de arroz			x	x	x	x
Molho de mostarda	x	x	x	x	x	x
Goma Xantana	x	x	x	x	x	x
Salicórnia	x	x	x			
Sal fino				x	x	x
Azeite extra virgem	x	x		x	x	
Alga Alface do mar	x	x		x		
Hortelã			x			
Piripiri					x	
Cogumelo shitake						x
Kombu	x	x				
Alga Dulse				x		
Paprika					x	
Wakame	x	x				
Louro					x	
Percebes	x					
Nori tostada		x				

Para efeito de análise comparativa, procedeu-se à análise de amostras comerciais de vinagretes (VC1, VC2 e VC3) selecionadas aleatoriamente no mercado nacional (**Figura 14 e Tabela 4**).

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.



Figura 14: Amostras de diferentes tipos de molho vinagrete comercial VC1, VC2 e VC3, respetivamente.

Tabela 4: Composição das diferentes amostras de vinagretes comerciais, segundo rotulagem própria das marcas.

VC1	VC2	VC3
água, óleo de colza, vinagre de vinho, azeite virgem extra, mostarda, vinagre de álcool, sal, regulador de acidez (ácido cítrico), conservante metabissulfito de potássio, açúcar, sal, sumo de limão concentrado, estabilizadores (alginato de sódio, goma xantana), conservante (sorbato de potássio), corante (beta-caroteno), antioxidante (extractos de alecrim), especiarias.	água, vinagre de vinho, óleo de colza, açúcar, sal, estabilizadores (alginato de sódio, goma xantana), plantas aromáticas, pimento vermelho, conservante (sorbato de potássio), antioxidante (extrato de alecrim), especiaria, corante (betacaroteno), extrato de alho, extrato de cebola.	água, aceto balsâmico di modena IGP (vinagre de vinho, concentrado de uva), vinagre de vinho tinto, azeite virgem extra, concentrado de sumo de maçã, sal, açúcar, corante (caramelo simples), espessante (goma xantana), aroma natural de maçã verde, conservante (sorbato de potássio), edulcorante (glicosídeos de esteviol), antioxidante (extractos de alecrim).

3.4 Metodologia no controlo da qualidade de vinagretes

3.4.1 Análises físico-químicas

Em conformidade ao artigo 7º do Decreto-Lei nº 174/2007 e baseado na “Determinação dos métodos de análises aplicáveis no sector do vinho”, proveniente do Regulamento (CEE) nº 2676/90 (Comissão das Comunidades Europeias, 1990), a metodologia oficial utilizada para a realização das análises nas amostras de vinagretes foi o “Compêndio dos Métodos Internacionais para Análises de Vinagres”, elaborado pela OIV (Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2007).

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

De acordo com a metodologia disponível no laboratório da Global Wines S.A., apenas foram determinados os parâmetros: pH, acidez total e cloreto de sódio.

3.4.1.1 Determinação do pH (OIV-MA-AS313-15)

À semelhança da determinação do pH do vinho, recorreu-se ao potenciómetro Hach Sension⁺ pH3 e determinou-se o pH das amostras (**Figura 15**).



Figura 15: Potenciómetro para determinação do pH de amostras aquosas.

3.4.1.2 Determinação da acidez total (OIV-MA-VI-01: R2018)

A titulação de determinação da acidez total é igual para vinhos e vinagres (**figura 16**), à exceção do cálculo final, sendo este ($AT=V \times 3$), expressa em g de ácido acético/L de solução.



Figura 16: Determinação da acidez total por titulação.

3.4.1.3 Determinação de teor de cloreto de sódio (NaCl) (OIV-MA-VI-11: R2000)

Uma vez que algumas das amostras continham na sua composição salicórnia (planta halófito) como substituto do sal fino, determinou-se o teor de cloreto de sódio. Esta determinação consiste numa titulação potenciométrica de iões Cl^- com uma solução de nitrato

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

de prata como solução titulante. A reação ocorre em meio ácido após medição do ponto potencial de equivalência.

3.4.2 Análises microbiológicas

À semelhança da análise química, a componente microbiológica dos vinagretes foi avaliada de acordo com a metodologia e meios de cultura disponíveis no laboratório de enologia da Global Wines S.A. Uma vez que a empresa tem implementada a análise microbiológica para quantificação de bolores e leveduras (Meio de cultura WLN) na matriz vinho, recorreu-se a este meio de cultura para avaliar a possível contaminação das amostras de vinagrete por estes microrganismos.

Devido à constituição ácida do vinagrete, recorreu-se também ao meio de cultura WL *Differential Agar* – **ANEXO C**, para quantificação de bactérias acéticas que, embora não esteja contemplado no plano de controlo e análise da empresa, é um meio que se encontra disponível para análises pontuais. Este meio de cultura difere do meio de bolores e leveduras pela presença do antibiótico cicloheximida, que o torna um meio seletivo.

Embora o método de filtração por membrana 0,45 µm seja a técnica implementada na análise de vinhos, para a análise de vinagretes, recorreu-se ao método de espalhamento em placa devido à consistência pastosa das amostras com um volume de 100 µL por amostra.

Com o intuito de prever o tempo de vida útil de prateleira dos vinagretes elaborados, todas as amostras foram avaliadas sensorialmente ao fim de um período de 30 dias em repouso à temperatura ambiente.

Em paralelo com o controlo microbiológico dos vinagretes, foi ainda realizado um ensaio de avaliação da viabilidade das leveduras encapsuladas, não sendo este um fator condicionante para a preparação dos vinagretes. Para esse fim, foram recuperadas leveduras da etapa do *dégorgement* na empresa.

Baseado na NP-1829 (1982), onde consta a preparação de amostras para análise microbiológica em géneros alimentícios, pesou-se 10 g de leveduras encapsuladas, homogeneizou-se em 90 mL de uma solução tampão esterilizada e inoculou-se 100 µL desta solução no meio de cultura WLN.

4. Resultados e discussão

4.1 Controlo da qualidade de vinhos

Todos os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas realizadas na matriz vinho, encontraram-se conformes e de acordo com o Plano de Controlo e Análise e a legislação em vigor.

4.2 Controlo da qualidade de vinagretes

4.2.1 Análise química

Os valores médios de pH, acidez total e teor de cloreto de sódio das amostras de molho vinagrete estão ilustrados na **Tabela 5**.

Tabela 5: Valores médios dos parâmetros analíticos das 9 amostras de vinagrete (média $\pm$ desvio padrão, n= 3).

Amostras	pH ($\bar{X} \pm DP$)	Acidez total (g de ácido acético/ L de solução) ($\bar{X} \pm DP$ e %)	Teor de Cloreto de Sódio (g/L de Na ⁺ em NaCl) ($\bar{X} \pm DP$)
463	3,46 $\pm$ 0,01	6,1 $\pm$ 0,06 0,61%	107,64 $\pm$ 0,15
501	3,51 $\pm$ 0,01	5,9 $\pm$ 0,06 0,59%	83,22 $\pm$ 0,13
V1	3,85 $\pm$ 0,02	4,1 $\pm$ 0,06 0,41%	292,22 $\pm$ 0,15
V2	3,70 $\pm$ 0,01	6,2 $\pm$ 0,06 0,62%	292,57 $\pm$ 0,15
V3	3,46 $\pm$ 0,01	5,3 $\pm$ 0,06 0,53%	83,20 $\pm$ 0,12
V4	3,88 $\pm$ 0,01	4,6 $\pm$ 0,12 0,46%	157,31 $\pm$ 0,15
VC1	2,99 $\pm$ 0,02	16,3 $\pm$ 0,12 1,63%	ND
VC2	3,36 $\pm$ 0,03	13,1 $\pm$ 0,35 1,31%	ND
VC3	3,34 $\pm$ 0,02	19,8 $\pm$ 0,90 1,98%	ND

ND – não determinado

As amostras V1 e V4 foram as que apresentaram valores de pH superiores e acidez total mais baixas. De acordo com Laranjeira *et al.* (2013), o pH ideal para um vinagrete deve ser inferior a 3,5 e a acidez total deve ser superior a 3,6% em termos de gramas de ácido acético por litro de solução. Quando os valores estão dentro desses parâmetros, a amostra de vinagrete é considerada microbiologicamente estável. Ao analisar os valores de pH apresentados anteriormente, observa-se que os vinagretes comerciais são os que apresentam os intervalos de pH mais baixos no geral e apenas duas amostras elaboradas apresentam pH inferior a 3,5, estando ainda muito próximas do limite.

Relativamente à acidez total, nenhuma das amostras apresentou uma acidez total superior a 3,6%, o que significa que todas podem estar sujeitas à ação de microrganismos que afetam a qualidade alimentar.

Relativamente à análise de cloreto de sódio, realizou-se uma comparação da presença de iões de Na^+ com base na quantidade de gramas de iões de Cl^- por litro de solução. Uma vez que apenas as amostras 463, 501 e V1 continham salicórnia na sua composição, não se verificou uma redução do teor de Na^+ nessas amostras face às restantes. Estes resultados demonstraram que a utilização da salicórnia não atingiu o objetivo inicial na elaboração dos vinagretes.

4.2.2 Análise microbiológica

Numa primeira fase, foi necessário definir o volume de amostra a inocular. Para esse fim, foram testados diferentes volumes (100 μL , 200 μL , 500 μL e 1000 μL) no meio de cultura WLN. Após o período de incubação, as placas foram avaliadas visualmente e determinou-se o volume ideal (100 μL), descartando os volumes em que as amostras apresentaram consistência líquida (**Figura 17**). Este ensaio apenas foi realizado para as amostras 463 e 501 uma vez que foram as primeiras amostras a estarem disponíveis para proceder ao controlo analítico.

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

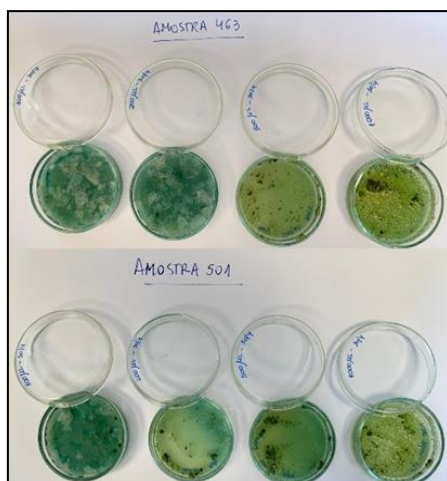


Figura 17: Inoculação (n=1) de diferentes volumes (100µL, 200µL, 500µL e 1000 µL) no meio WLN das amostras 463 (superior) e 501 (inferior).

Para validar o volume de amostra de 100 µL, testou-se uma nova amostra por vinagrete (n=1) no meio WLN (**Figura 18**) e no meio WL *Differential* (**Figura 19**). Os resultados obtidos evidenciaram a ausência de contaminação em ambos os meios de cultura nas duas amostras de molho vinagrete. Por ausência de volume suficiente de amostra, não foi possível realizar os ensaios em triplicado.

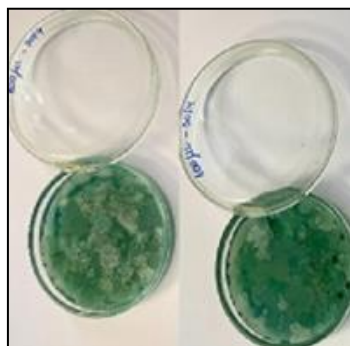


Figura 18: Amostras 463 e 501 de vinagrete inoculadas em meio de cultura WLN.

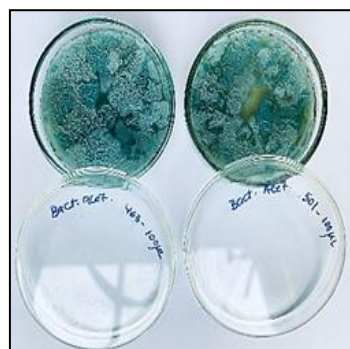


Figura 19: Amostras 463 e 501 de vinagrete inoculadas em meio de cultura WL *Differential*.

Posteriormente, procedeu-se ao controlo microbiológico das restantes quatro formulações elaboradas em ambos os meios de cultura. Todas estas análises foram realizadas em triplicado (**Figura 20** e **Figura 21**).

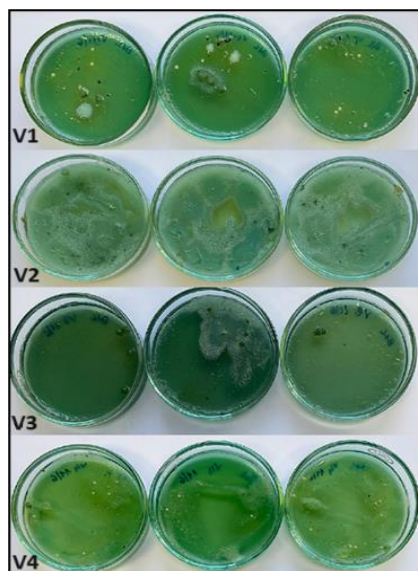


Figura 20: Amostras V1, V2, V3 e V4 de vinagrete inoculadas em meio de cultura WLN.

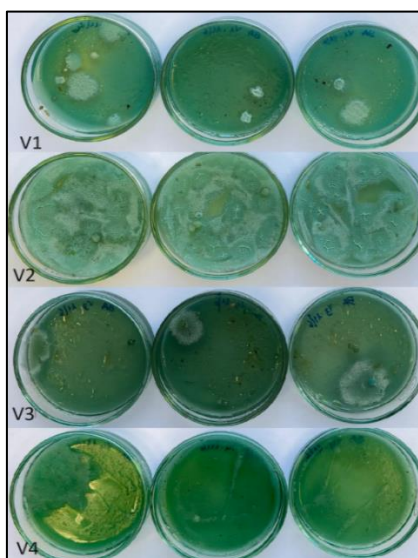


Figura 21: Amostras V1, V2, V3 e V4 de vinagrete em meio de cultura WL *Differential*.

Relativamente ao meio de cultura WLN, verificou-se o crescimento de leveduras apenas nas amostras V1 e V4 em todas as placas. A formulação V1 apresentou uma contagem média de 5 UFC/100 μ L e a formulação V4 uma média de 8 UFC/100 μ L. No meio de cultura WL *Differential*, apenas a formulação V1 apresentou contaminação nas três placas de cultivo, em média 2 UFC/100 mL. À semelhança das amostras 463 e 501, a amostra V1 que também

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

continha salicórnica na sua constituição, mostrou-se com um resultado contraditório face às anteriores, apresentando contaminação em ambos os meios de cultura. Possivelmente, a causa do crescimento microbiológico verificado nas duas amostras teve origem na preparação dos vinagretes.

Os resultados dos vinagretes comerciais foram satisfatórios com ausência de crescimento para todas as amostras ($n=3$) em ambos os meios de cultura, podendo ser um dos pontos a ressaltar a segurança alimentar dos produtos comerciais (**Figura 22** e **Figura 23**).

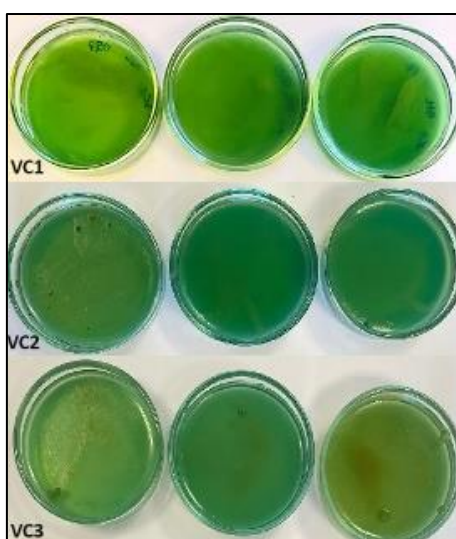


Figura 22: Amostras comerciais de vinagre (VC1, VC2 e VC3) inoculadas em meio de cultura WLN.

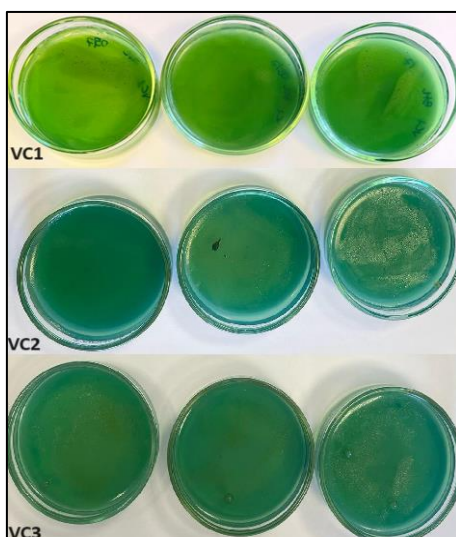


Figura 23: Amostras comerciais de vinagre (VC1, VC2 e VC3) inoculadas em meio de cultura WL *Differential*.

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

Das análises de determinação da vida útil de prateleira, foi analisado o aspeto visual e olfativo. Foi possível observar alteração da cor em todas as amostras para uma tonalidade mais clara e com turvação. Olfativamente, reportaram um odor desagradável, semelhante a um produto rancificado, indicativo de amostra deteriorada (**Figuras 24 e 25**).



Figura 24: Amostras de vinagretes (501 e 463, respetivamente) expostas a temperatura ambiente durante um período de 30 dias.



Figura 25: Amostras de vinagretes (V1, V2, V3 e V4, respetivamente) expostas a temperatura ambiente durante um período de 30 dias.

Relativamente ao ensaio de avaliação da viabilidade das leveduras encapsuladas, não se observou crescimento microbiano após o período de incubação, constatando a inviabilidade das leveduras encapsuladas após a segunda fermentação em garrafa. Este era o resultado esperado uma vez que se objetivou utilizar as esferas de alginato de cálcio após a sua utilização tecnológica na produção de vinho espumante (**Figura 26**).

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

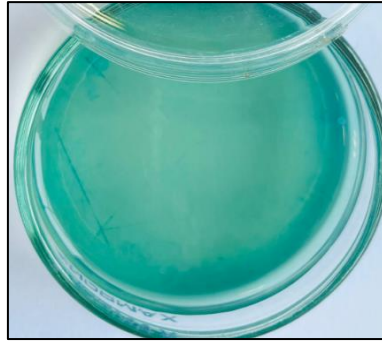


Figura 26: Inoculação de leveduras encapsuladas após segunda fermentação em meio de cultura WLN.

5. Conclusão e sugestões

Este estágio proporcionou-me uma visão abrangente do setor vitivinícola e reforçou a importância do rigor analítico na produção de vinhos. Apesar do acompanhamento criterioso, é necessário reforçar continuamente a formação da equipa, atualizando conhecimentos e explorando novas metodologias disponíveis no mercado.

Relativamente ao controlo analítico das formulações dos vinagretes, foi um trabalho bastante desafiante devido à escassez de bibliografia existente e à ausência de legislação específica. Alguns dos valores de referência foram obtidos a partir de artigos de revisão bibliográfica ou regulamentação alimentar de vinagres. Analiticamente, a determinação do teor de cloreto de sódio, apresentou algumas limitações relacionadas com o elevado consumo de reagente nas titulações. Seria recomendável explorar outras formas de determinação como, por exemplo, um teste rápido com gamas de valores aproximados de teor de cloreto de sódio. Realça-se ainda o facto de que essa metodologia não está disponível na Global Wines S.A.

Conclui-se que será necessário um maior cuidado na seleção de matérias-primas e na manipulação durante a produção dos vinagretes, de forma a evitar contaminação microbiológica. O presente trabalho também permitiu constatar que será necessária a reformulação dos vinagretes, no sentido de diminuir o seu pH e incrementar os valores de acidez total, permitindo um resultado final de $\text{pH} < 3,5$ e acidez total $> 3,6\%$, para assegurar o aumento da sua estabilidade microbiológica e consequente extensão do tempo de vida útil de prateleira.

Esta otimização das formulações será crucial para garantir a segurança alimentar e viabilizar a entrada dos vinagretes no mercado, promovendo assim, uma solução gastronómica sustentável e contribuindo para economia circular numa empresa que produz vinho espumante.

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

Bibliografia

Adams, W. M. (2019). The Future of Sustainability: Re-thinking Environment and Development in the Twenty-first Century. *The Emerald Handbook of Management and Organization Inquiry, January*, 197–206. <https://doi.org/10.1108/978-1-78714-551-120191012> [Consultado em 01 de agosto de 2024].

ASAE. (2016). O vinho. *ASAE News*. <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-104-dezembro-2016/o-vinho.aspx> [Consultado em 18 de julho de 2024].

C.V.R. Dão. (2021). Região Demarcada do Dão.

Caliori, V. ., Rosier, J. ., & Bordignon-Luiz, M. (2013). Vinhos Espumantes : Métodos De Elaboração. *Evidência*, 13(1), 65–77.

Cardoso, A. D. (2019). *O vinho da uva à garrafa* (2ª ed.) Quântica Editora. Agrobook.

Comissão das Comunidades Europeias. (1990). Regulamento (CEE) N° 2676/90 da comissão de 17 de setembro de 1990 que determina os métodos de análise ao vinho. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, 3, 192.

Comissão Europeia. (2019). Regulamento (UE) n° 934/2019. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 4, 52.

Condalab. (2019a). Agar Nutriente WL.

Condalab. (2019b). *Brettanomyces Agar*. 1–2.

Costeira, J. C. B. S. (2021). Estudo comparativo de dois métodos de espumatização, método clássico (tradicional) e método de cuba fechada (Charmat). Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia.

Curvelo-Garcia, A. S., & Barros, P. (2015). *Química Enológica métodos analíticos*. Publindústria, Edições Técnicas.

DGADR. (2012). Elaboração de Planos de Controlo em Modo de Produção Biológico. In Procedimento operativo PO-001/2011: Vol. Revisão n° (pp. 1–42).

Dias, T. M. (2017). Bacteriocinas em alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais.

Estevão, W. (2019). *Cozinha Fria (garde manger)*. ETEC Benedito Storani Jundiáí.

European Union. (2013). Regulamento (UE) N° 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 dezembro de 2013. *Official Journal of the European Union*, 671–854. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R1308> [Consultado em 18 de julho de 2024].

Global Wines S.A. (2024a). Global Wines Web Page. <https://www.globalwines.pt/#marcas> [Consultado em 23 de julho de 2024].

Global Wines S.A. (2024b). Manual da Segurança Alimentar (Edição K).

Global Wines S.A. (2024c). Métodos Internos.

Global Wines S.A. (2024d). Plano de Controlo e Análises - Revisão 2024.

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

Gonçalves, L., & Rodrigues, S. (2020). Imobilização De Leveduras Em Gel De Alginato E Pectina. <https://doi.org/10.22533/at.ed.54721010411> [Consultado em 17 de julho de 2024].

Guedes, P. (2021). *Fizilogia: Elaboração de vinhos espumantes segundo o método clássico* (1ª ed.). Quântica Editora.

Guiné, R. P. F. (2016). Estudo Prévio de uma unidade industrial para produção de vinagrete sólido. 50, 217–228.

Held, P. (2010). Monitoring growth of beer brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* - The utility of synergy H1 for providing high quality kinetic data for yeast growth applications. *Biotek Application Note*, 1–6.

IVV. (2021). Evolução da Produção Mundial de Vinho. Instituto Da Vinha e Do Vinho, 2023. <https://www.ivv.gov.pt/np4/6953.html> [Consultado em 01 de agosto de 2024].

IVV. (2022a). Referencial Nacional De Certificação De Sustentabilidade Do Setor Vitivinícola. [https://www.ivv.gov.pt/np4/786/%7B\\$clientServletPath%7D/?newsId=10176&fileName=IVV_Refereencial_Sustentabilidade_IVV.pdf](https://www.ivv.gov.pt/np4/786/%7B$clientServletPath%7D/?newsId=10176&fileName=IVV_Refereencial_Sustentabilidade_IVV.pdf) [Consultado em 01 de agosto de 2024].

IVV. (2022b). Vinhos e aguardentes de Portugal - anuário 2022. Instituto da Vinha e do Vinho I.P.

IVV. (2024). Informação de mercado: Apuramento da produção de vinho na campanha 2023/2024. 7–8.

Kovaleski, G., Bittencourt, J., & Rodrigues, S. (2020). Estudo da imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio.

Laranjeira, C., Vaz, J., Torgal, I., Faro, M., Lima, M., Ribeiro, M., & Henriques, M. (2013). Tecnologia vinagreira: Desenvolvimento de novos produtos com adição de *Physalis peruviana*-vinagrete. *Revista Da UI_IPSantarém*, 216–235.

Leite, J. G. (2008). Aplicação de FTIR na preservação do património. 020805011.

Mayson, R. (2003). *Os vinhos e vinhas de Portugal* (Tito Lyon de Castro (ed.)). EUROPA-AMERICA. <https://books.google.pt/books?id=-AWsPgAACAAJ> [Consultado em 18 de julho de 2024].

Ministério da agricultura do desenvolvimento rural e das pescas. (2007). Decreto-Lei Nº 174/2007 de 8 de Maio. *Diário Da República*, 2995–2997.

Moraes, V. de, & Locatelli, C. (2010). Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. *Evidência*, 10, 57–68. <http://editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia/article/view/1159> [Consultado em 18 de julho de 2024].

Morais, M. ., Bonetti, L. ., & Rocha, E. (2014). Análise da viabilidade e a curva de crescimento de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* de uma destilaria de etanol do Pontal do Triângulo Mineiro. *Intercursos Revista Científica*, 2, 164–172.

Nicolau, T. M. P. (2011). Leveduras de alteração em vinhos. *Analytical Biochemistry*, 1. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-59379-1%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00002-7%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.024%0Ahttps://doi.org/10.1080/07352689.2018.1441103%0Ahttp://www.chile.bmw-motorrad.cl/sync/showroom/lam/es/> [Consultado em 17 de outubro de 2024].

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia. (2011). Regulamento (UE) N.º 1169/2011. *Jornal Oficial Da União Europeia*, L 304, 18–63.

Pinto, F. M. dos S. J. T. (2022). Produção de vinho branco a partir da casta Arinto na Denominação de Origem Bucelas.

Portugal, F. R., Silva, S., Taillandier, P., & Strehaiano, P. (2003). As Leveduras Imobilizadas : Utilizações enológicas actuais. *Vinidea.Net – Revista Internet Técnica Do Vinho*, 6, 1–8.

Proenol - ProElif. (2024). *Leveduras Encapsuladas* (pp. 1–2).

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications* (2ª ed., Vol. 1). John Wiley & Sons.

Silva, C. da C. (2008). A base de dados da CVR Dão, relativos à atribuição da denominação de origem no período de 1998 a 2004, como ferramenta de conhecimento da região e do sector.

Sousa, A., Ana F, V., & Nunes, C. (2017). Desperdícios da vinicultura: potenciais aplicações e sustentabilidade. *Novas Edições Acadêmicas*, 4(1), 9–15.

Zamora F., Biochemistry of Alcoholic Fermentation (chapter 1). In: Moreno-Arribas and Polo Editors. 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer Ed. ISBN: 978-0-387-74116-1.

ANEXO A - Ficha técnica do meio de cultura *Agar Nutriente WL* para deteção de bolores e leveduras da marca Condalab.



Agar Nutriente WL

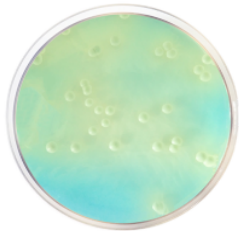
Para la determinación de flora microbiana en procesos de fermentación y fabricación de cerveza

Cat. 1086

Información práctica

Aplicaciones	Categorías
Recuento selectivo	Microorganismos de la industria cervecera

Industria: Alimentación / Bebidas alcohólicas / Fermentación



Principios y usos

Agar Nutriente WL, basado en la formulación de Green y Grey, se recomienda para el control de fermentaciones industriales, particularmente la fabricación de cerveza. Con un pH de 5,5 se pueden hacer recuentos verdaderos de levaduras de cerveza. Con un pH de 6,5 el medio es ideal para levadura de panadería y alcohol destilado.

La triptona proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. La dextrosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía. El extracto de levadura es una fuente de vitaminas, particularmente del grupo B. El fosfato monopotásico es el tampón. Los cloruros de potasio, calcio y férrico proporcionan iones esenciales para el equilibrio osmótico. Los sulfatos de magnesio y manganeso son fuentes de cationes divalentes. El verde de bromocresol es el indicador de pH. El agar bacteriológico es el agente solidificante.

Fórmula en g/L

Agar bacteriológico	15	Verde de bromocresol	0,022
Cloruro cálcico	0,125	Dextrosa	50
Cloruro férrico	0,0025	Sulfato magnésico	0,125
Sulfato de manganeso	0,0025	Fosfato monopotásico	0,56
Cloruro potásico	0,425	Triptona	5
Extracto de levadura	4		

Preparación

Suspender 75 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C, mezclar bien y dispensar en platos.

Instrucciones de uso

Inocular e incubar a una temperatura de 30 °C y observar después de 24 - 48 horas.

Ambas fórmulas WL Nutrient (WLN) y WL Differential (WLD) se usan en conjunto, ya que con WLN Agar las bacterias podrían no ser detectadas a menos que la cantidad de células de levadura sea muy pequeña. Se debe usar 1 placa WLN y 2 placas WLD.

- La placa WLN Agar se incuba aeróbicamente para el recuento total de levaduras en la placa.
- Una de las placas de agar WLD se incuba aeróbicamente para bacterias de ácido acético: *Flavobacterium*, *Proteus*, bacterias termófilas y otras.
- La segunda placa WLD se incuba anaeróbicamente para la investigación de bacterias lácticas y especies de *Pediococcus*.

Todas las placas se incuban, en general, a 25 °C en el caso de la cerveza, y a 30 °C para las levaduras de panadería y alcohólicas de malta. Las placas se incuban durante 2 -10 días hasta 2 semanas, según la flora presente. Los recuentos se realizan a intervalos regulares durante este período.

Inspired by knowledge

Página 1 de 2 - N° revisión 1 - Fecha 28/10/2019

www.condalab.com

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

Control de calidad				
Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25°C)
Sin restos	Polvo fino	Tostado claro con tono azul	Gris-azul	5,5 ± 0,2

Test microbiológico	
Condiciones de incubación: (30 °C / 24-48 h)	
Microrganismos	Especificación
Escherichia coli ATCC 25922	Crecimiento moderado
Proteus mirabilis ATCC 25933	Crecimiento moderado
Sacharomyces cerevisiae ATCC 9080	Buen crecimiento
Lactobacillus fermentum ATCC 9338	Crecimiento moderado
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763	Buen crecimiento

Almacenamiento
Temp. Min.: 2 °C
Temp. Max.: 25 °C

Bibliografía
Green, S.R. and P.P. Gray 1950. Paper read at American Society of Brewing Chemist Meeting. Wallerstein Lab. Commun 1 2:43. Green, S.R. and P.P. Gray 1950. A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. Wallersteia Lab. Commun 13:357.
MacFaddin J.D. 1985. media for isolation cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. p. 854-856 Williams Wilkins, Baltimore, MD.

Inspired by knowledge

Página 2 de 2 - Nº revisión 1 - Fecha 28/10/2019

www.condalab.com

ANEXO B - Ficha técnica do meio de cultura *Brettanomyces* Agar para deteção de *Brettanomyces* spp. da marca Condalab.



Agar Brettanomyces

Para el cultivo de Brettanomyces

Cat. 2006

Información práctica

Aplicaciones	Categorías
Enriquecimiento	Brettanomyces

Industria: Bebidas alcohólicas

Principios y usos

Agar Brettanomyces es un medio utilizado para el cultivo de Brettanomyces de vinos.

Brettanomyces es un género de levadura capaz de crecer en altas concentraciones de alcohol y de azúcares fermentados que no han sido utilizados por *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación. La presencia de Brettanomyces se asocia con la aparición de extraños aromas del vino debido a la producción de 4-etil guayacol y 4-etil fenol.

Brettanomyces también se llama Dekkera (nombre dado a especies con reproducción sexual y, por lo tanto, formación de esporas por meiosis). Generalmente se encuentra en vinos tintos en barriles o en almacenamiento a granel, ya que, los ácidos necesarios para formar algunos de los aromas indicativos se extraen de las pieles de la uva, pero también se han encontrado infecciones en Chardonnay y Sauvignon Blanc.

La dextrosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía. La peptona y el extracto de malta proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es fuente de vitaminas, particularmente del grupo B. La tiamina es un factor de crecimiento. Se agregan agentes selectivos para mejorar la recuperación de Brettanomyces a través de la inhibición de contaminantes comunes como *Saccharomyces cerevisiae*.

Fórmula en g/L

Dextrosa	10	Agar bacteriológico	20
Verde de bromocresol	0,022	Cloranfenicol	0,1
Cicloheximida	0,01	Extracto de malta	3
Peptona	5	Tiamina	0,02
Extracto de levadura	3	Base nitrogenada de levadura	3
Ácido cumárico	0,1		

Preparación

Suspender 44,2 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver por calentamiento con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Agregar 16 ml de etanol y mezclar bien. Hervir durante 10 minutos y verter en placas de Petri. NO AUTOCLAVAR.

Instrucciones de uso

Inocular e incubar a una temperatura de 25-30 °C y observar después de 7 días

Control de calidad

Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25°C)
Sin restos	Polvo fino	Beige	Verde-azulado	5,3±0,2

Test microbiológico

Condiciones de incubación: (25-30 °C / 7 días)

Inspired by knowledge

Página 1 de 2 - N° revisión 0 - Fecha 14/05/2019

www.condalab.com

Controlo da qualidade de vinho e de vinagretes formulados para valorizar um subproduto da produção de vinhos espumantes.

Microrganismos	Especificación	Reacción característica
Dekkera anomala ATCC 10562	Buen crecimiento	Fermentación de lactosa (+), Asimilación de succinato (+), Asimilación de nitrato (+)
Salmonella typhimurium ATCC 14028	Crecimiento inhibido	
Escherichia coli ATCC 25922	Crecimiento inhibido	
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Crecimiento inhibido	
Dekkera bruseleensis ATCC 36234	Buen crecimiento	Fermentación de lactosa (-), Asimilación de succinato (-), Asimilación de nitrato (+)
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763	Crecimiento inhibido	

Almacenamiento

Temp. Min.:2 °C
Temp. Max.:25 °C

Bibliografía

Winemaking update. Brettanomyces / dekkera. Control y detección en bodegas.
Wine Microbiologists practical application and procedure.
Silva, P., Cardoso, and H. Gerós. 2004. Studies on the wine spoilage capacity of Brettanomyces/Dekkera spp. Am. J. Enol. Vitic. 55:

Inspired by knowledge

Página 2 de 2 - Nº revisión 0 - Fecha 14/05/2019

www.condalab.com

ANEXO C - Ficha técnica do meio de cultura WL *Differential Agar* para deteção de Bactérias Acéticas da marca Condalab.



WL Differential Agar

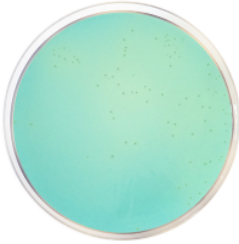
Cat. 1026

Selective medium used in the control of industrial fermentation processes, especially in brewery

Practical information

Applications	Categories
Selective enumeration	Microorganisms of the brewing industry
Selective isolation	Microorganisms of the brewing industry

Industry: Alcoholic beverages



Principles and uses

WL Differential Agar is a selective medium for the isolation and enumeration of microbial flora used together with WL Nutrient Agar (Cat. 1086) for the control of the manufacture of beer and other fermentation processes by yeasts. Both media are widely used in the industries of vinegar, bread yeasts, grape and wine-growing and distilled spirits. In the production of yeasts for the bakery and distillery industries, the pH of the media is adjusted to 6.5.

The medium allows the selective multiplication of yeasts in fermentation liquids, which contain a microflora mix consisting of fungi and bacteria. When the number of yeasts present is relatively small, certain bacteria can also be detected.

Tryptone provides nitrogen, vitamins, minerals and amino acids essential for growth. Dextrose is the fermentable carbohydrate providing carbon and energy. Yeast extract is a source of vitamins, particularly of the B-group. Monopotassium phosphate is the buffer. Potassium, Calcium and Ferric chlorides all provide essential ions for the osmotic balance. Magnesium and Manganese sulfates are sources of divalent cations. Bromocresol purple is the pH indicator. Bacteriological agar is the solidifying agent. The addition of 0.004 grams of Cycloheximide converts the WL Nutrient formula into a differential medium, which inhibits the development of yeasts and molds while permitting the notable proliferation of the bacteria present in the fermentation liquids and subsequent identification and enumeration.

Formula in g/L

Dextrose	50	Bacteriological agar	20
Bromocresol green	0,022	Calcium chloride	0,125
Cycloheximide	0,004	Ferric chloride	0,0025
Magnesium sulfate	0,125	Manganese sulfate	0,0025
Monopotassium phosphate	0,55	Potassium chloride	0,425
Tryptone	5	Yeast extract	4

Preparation

Suspend 80 grams of the medium in one liter of distilled water. Mix well and dissolve by heating with frequent agitation. Boil for one minute until complete dissolution. Sterilize in autoclave at 121°C for 15 minutes.

Instructions for use

- Inoculate initial suspension and/or diluted sample.
- Extend the inoculum with a sterile loop on the agar surface.
- Incubate the plates in an inverted position at a temperature of 35±2 °C for 24-48 hours.

Time and temperature of incubation are important factors according to the type of yeast. In general, temperatures of 25°C with the beer yeasts and 30°C with the bread and other alcoholic fermentation yeasts are appropriate. The time of incubation varies from 2 to 7 days and up to 14 days, depending on the flora found.

Inspired by knowledge

Page 1 of 2 - Revision number 1 - Date 28/10/2019

www.condalab.com

Likewise, the atmosphere chosen for incubating the culture must be appropriate. The bread yeasts are incubated aerobically while the alcoholic fermentation yeasts are incubated anaerobically and in the presence of CO₂.

Quality control

Solubility	Appearance	Color of the dehydrated medium	Color of the prepared medium	Final pH (25°C)
w/o rests	Fine powder	Beige with blue tint	Blue	5,5 ± 0,2

Microbiological test

Incubation conditions: (30 °C / 24-48 h)

Microrganisms	Specification
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Good growth
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	Good growth
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	Inhibited growth
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	Good growth
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	Inhibited growth

Storage

Temp. Min.: 2 °C
Temp. Max.: 25 °C

Bibliography

Green and Grey, Wallenstein, Lab. Comm. 13:357, 1950. Green and Grey, Wallenstein, Lab. Comm. 14:169, 1951. Applicable to bacteriological investigation in brewing Wallenstein Lab. Commus 13: 357.