

Edgar Fernando Martins Ribeiro

Controlo microbiológico na produção de vinhos:
estudo de caso numa adega da região
Demarcada do Dão

Orientador: Doutora Goreti Botelho

Coimbra, 2023

Edgar Fernando Martins Ribeiro

**Controlo microbiológico na produção de vinhos:
estudo de caso numa adega da região
Demarcada do Dão**

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, 2023

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, a toda a equipa de enologia da Global Wines S.A. toda a ajuda, amizade e disponibilidade durante os 6 meses de estágio, nomeadamente ao Miguel Dias e às enólogas Cristina Costa e Isabel Escudeiro.

Um agradecimento especial à Dra. Ana Rodrigues e à Sara Miranda pela oportunidade concedida em estagiar no laboratório da Global Wines S.A. e ao Eng. Osvaldo Amado e à Maria Inês Santos, por todos os ensinamentos, conselhos e conhecimentos transmitidos durante o período de estágio.

O meu estágio não teria sido a mesma coisa sem a minha “bengala” do laboratório que nunca me deixou desistir, mesmo quando às vezes a vontade era grande! Obrigado do fundo do coração, Joana Luís! És a melhor!

Agradeço também à Professora Goreti Botelho a disponibilidade e simpatia demonstrada para orientar o meu trabalho, bem como as sugestões e orientações dadas durante todo este período. Obrigado, Professora!

Aos meus colegas de mestrado agradeço a amizade e o espírito de equipa ao longo destes 2 anos de curso, em especial, à Rita e à Inês. Obrigado por tudo!

Um especial agradecimento a todos os professores por todos os conhecimentos transmitidos e por me fazerem “sentir em casa” na ESAC.

E porque a vida é feita de ciclos, só tenho de agradecer também à minha “casa-mãe”: o departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra. Um grande bem-haja a todos os professores, funcionários e colegas de curso da licenciatura em Biologia!

À Rebeca e Carolina Faria: não há palavras para descrever a nossa amizade. Obrigado por tudo! Sempre juntos!

À minha família: pais, avó, irmãos, cunhado e sobrinho. Nunca conseguirei retribuir os sacrifícios, paciência e apoio que me deram. Obrigado!

Um bem-haja a todos!

Resumo

Este relatório é fruto do trabalho desenvolvido no estágio realizado no laboratório de Enologia da Global Wines S.A., empresa vitivinícola da região do Dão localizada em Carregal do Sal, de 3 de janeiro a 30 de junho de 2023, no âmbito do Mestrado em Engenharia Alimentar da Escola Superior Agrária de Coimbra, pertencente ao Instituto Politécnico de Coimbra.

O principal objetivo deste estágio foi garantir a eficácia dos métodos analíticos microbiológicos implementados no processo de produção de vinhos engarrafados com vista à correta monitorização dos processos e otimização dos mesmos.

Como tal, pretendeu-se adquirir conhecimentos teóricos e práticos no âmbito da rotina diária de análises físico-químicas e microbiológicas do laboratório da Global Wines S.A., comprovar a eficácia dos vários processos de estabilização microbiológica no decorrer do processo de produção dos vinhos tranquilos e espumantes, nomeadamente na etapa de tiragem, bem como controlar o processo de higienização em adega, através de análises microbiológicas e testes de bioluminescência.

Os resultados obtidos no trabalho desenvolvido permitiram reconhecer a importância da existência de uma etapa de estabilização microbiológica no processo de produção de vinhos tranquilos e vinhos espumantes, com o objetivo de reduzir e/ou eliminar a presença de microrganismos nos vinhos engarrafados e não comprometer a segunda fermentação em garrafa, no caso dos vinhos espumantes. Para além disso, o controlo efetuado a nível da higienização em adega foi essencial para o trabalho diário dos colaboradores da empresa, ao identificar as zonas críticas passíveis de maior presença microbiana e, como tal, de atenção redobrada aquando da ocorrência da higienização dos depósitos e equipamento de filtração em adega.

Palavras-Chave: qualidade e segurança alimentar; produção de vinhos; análises físico-químicas e microbiológicas

Abstract

This report is the result of the work carried out during the internship conducted at the Enology laboratory of Global Wines S.A., a winery located in the Dão region in Carregal do Sal, from January 3rd to June 30th, 2023, as part of the Master's program in Food Engineering at the Agrarian School of Coimbra, affiliated with the Polytechnic Institute of Coimbra.

The main objective of this internship was to ensure the effectiveness of microbiological analytical methods implemented in the production process of bottled wines, aiming for proper process monitoring and optimization.

As such, the goal was to acquire theoretical and practical knowledge within the scope of the daily routine of physical-chemical and microbiological analyses at the Global Wines S.A. laboratory. This included proving the effectiveness of various microbiological stabilization processes during the production of still and sparkling wines, especially during the tirage stage. Additionally, it involved controlling the hygienization process in the winery through microbiological analyses and bioluminescence tests.

The results obtained in the developed work allowed to recognize the importance of having a microbiological stabilization stage in the production process of still and sparkling wines. This stage aims to reduce and/or eliminate the presence of microorganisms in bottled wines and avoid compromising the second fermentation in the case of sparkling wines. Furthermore, the control of hygienization in the winery was crucial for the daily work of the company's employees. It helped identify critical areas susceptible to higher microbial presence, requiring increased attention during hygienization of tanks and filtration equipment in the winery.

Keywords: food quality and safety; wine production; physico-chemical and microbiological analyses

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice	iv
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	ix
1. Introdução	1
1.1. Breve descrição do local de estágio.....	1
1.2. Região Demarcada do Dão.....	3
2. Objetivos do estágio.....	6
3. O vinho.....	7
3.1. Composição físico-química do vinho.....	8
3.2. O processo de vinificação	10
3.2.1. Produção de vinhos tranquilos	10
3.2.2. Produção de vinho espumante	15
4. A microbiologia ao serviço da produção de vinhos	20
4.1. Fermentação alcoólica e malolática	20
4.2. O papel das leveduras na produção de vinhos	22
4.3. Doenças no vinho causadas por microrganismos	26
5. Estabilização microbiológica dos vinhos.....	28
5.1. Processo de higienização	28
5.2. Aplicação de conservantes	30
5.3. Pasteurização	32
5.4. Filtração	34
5.5. Clarificação e centrifugação.....	36
6. Controlo da qualidade no processo de produção de vinhos	37
6.1. Análises microbiológicas.....	37
6.2. Análises físico-químicas	39
6.2.1. SO ₂ Livre e Total	40
6.2.2. Acidez total.....	40
6.2.3. Teor alcoólico	41
6.2.4. Acidez volátil	42
6.2.5. Massa volúmica e Extrato seco (a 20°C)	43
6.2.6. Determinação do pH	43
6.2.7. Turbidez	44

7. Aplicação de métodos de análise microbiológica.....	45
a) Análise microbiológica de controlo de engarrafamento de vinhos.....	45
b) Análise microbiológica na etapa de tiragem na produção de vinhos espumantes..	47
c) Controlo microbiológico do processo de higienização.....	51
Sugestões de melhoria.....	57
Conclusão.....	59
Bibliografia.....	61
ANEXO I - Detergentes e/ou desinfetantes mais aplicados no processo de higienização.....	68
ANEXO II - Composição do meio de cultura Agar <i>Brettanomyces</i> , da empresa Condolab.....	69
ANEXO III - Composição do meio de cultura Agar Nutriente WL, da empresa Condolab.....	70
ANEXO IV - Procedimento: método de filtração por membrana para pesquisa de microrganismos viáveis.....	71
ANEXO V - Amostragem 7a) - Análise microbiológica de controlo de engarrafamento de vinhos.....	73
ANEXO VI - Amostragem 7b) - Análise microbiológica na etapa de tiragem na produção de vinhos espumantes.....	74
ANEXO VII - Amostragem 7c) - Controlo microbiológico do processo de higienização.....	77

Lista de Figuras

Figura 1 – Sede da Global Wines S.A., localizada no concelho de Carregal do Sal, em plena Região Demarcada do Dão (DOC Dão) e respetivo logótipo da empresa.....	1
Figura 2 – Localização geográfica das várias regiões vitivinícolas que dão origem às marcas da Global Wines, reconhecidas a nível internacional.	2
Figura 3 – Localização geográfica da Região Demarcada do Dão e respetivas sub-regiões.	4
Figura 4 – Selo de garantia de vinho DOC Dão, após certificação atribuída pela Comissão Vitivinícola Regional do Dão (de acordo com o Decreto-Lei nº94/2012)	4
Figura 5 – Evolução da produção de vinho (em hl) na Região Demarcada do Dão, entre 2015 e 2023.	5
Figura 6 - Evolução da produção mundial de vinho (excluídos sumos e mostos)	7
Figura 7 - Evolução do consumo mundial de vinho	8
Figura 8 – Principais açúcares presentes na uva e no mosto e passíveis de sofrerem fermentação alcoólica. A glucose (A) é uma aldo-hexose e a frutose (B) é uma cetohexose.	9
Figura 9 – Principais componentes do vinho	9
Figura 10 – Fluxograma de produção de vinhos tranquilos (brancos, rosés e tintos) na empresa Global Wines S.A., com as etapas que decorrem na zona da adega (Etapas 1-11).	11
Figura 11 – Fluxograma de produção de vinhos tranquilos (brancos, rosés e tintos) na empresa Global Wines S.A., com as etapas que decorrem na zona de engarrafamento (Etapas 12-21).	13
Figura 12 – Fluxograma de produção de vinhos espumantes na empresa Global Wines S.A..	16
Figura 13 – Processo de produção de vinho espumante: A – Tiragem com leveduras livres; B – Tiragem com leveduras encapsuladas.....	17
Figura 14 – Classificação dos vinhos espumantes, tendo em conta o teor de açúcares (adaptado de Reg. (CE) nº 607/2009, Anexo XIV - Parte A).....	19
Figura 15 – Etapas da fermentação alcoólica, processo em que se converte a glucose em etanol.	21
Figura 16 – Fermentação malolática, realizada por bactérias do ácido láctico.	22
Figura 17 – Distinção entre os vários tipos de leveduras de contaminação no vinho...	23
Figura 18 – A: Observação de células de <i>Brettanomyces</i> através de microscopia com contraste de fase (1.000X); B: Aspeto típico de colónias de <i>Brettanomyces</i> spp., inoculadas em meio de cultura seletivo para deteção de <i>Brettanomyces</i> spp..	25

Figura 19 - Formação de 4-etil-guaiacol e 4-etil-fenol a partir dos seus precursores hidroxicinâmicos, presentes no mosto.....	25
Figura 20 – Conjunto de etapas a cumprir de modo a se conseguir uma boa higienização.	29
Figura 21 – Tipos de sujidade a eliminar no processo de higienização.	29
Figura 22 – Propriedades da aplicação do dióxido de enxofre na produção de vinhos.	31
Figura 23 – Estrutura química do DMDC (dicarbonato de dimetilo).	32
Figura 24 – Gráficos tempo-temperatura dos vários tratamentos térmicos aplicados nos vinhos: A – pasteurização; B – pasteurização flash; C – pasteurização em garrafa (túnel); D – engarrafamento a quente (termolização).	34
Figura 25 - Equipamento de filtração do vinho utilizado na empresa Global Wines S.A.: A – Filtro de terras; B – Filtro de placas; C – filtro de membranas.	35
Figura 26 – Processo de colagem, uma técnica de clarificação aplicada na produção de vinhos.....	36
Figura 27 – Método de filtração por membrana, usado na deteção e quantificação de microrganismos presentes em vinhos engarrafados.....	37
Figura 28 – Equipamento para análises sumárias do vinho em uso no laboratório da Global Wines S.A.	39
Figura 29 – Ebulliómetro elétrico GAB (A) com respetivo disco (B) para determinação do teor alcoólico, em uso no Laboratório da Global Wines S.A.	42
Figura 30 – Aparelho de destilação Cazenave-Ferré, para determinação da acidez volátil em vinhos, em uso no laboratório da Global Wines S.A.	43
Figura 31 – A: Potenciómetro Hach Sension+pH3 para determinação do pH em vinho; B – Turbidímetro HI83749 (Hanna Instruments) para determinação da turbidez em vinho.	44
Figura 32 – Observação visual das placas inoculadas com as amostras em estudo, recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana. As amostras foram recolhidas antes e após a estabilização microbiológica, com vista à pesquisa de bolores e leveduras : A – amostra de vinho tinto; B – amostra de vinho branco.....	46
Figura 33 – Controlo da higienização com recurso à bioluminescência A – Equipamento: Zaragatoa UltraSnap e Luminómetro Ensure Touch (Higiene); B: Representação esquemática da reação química entre a molécula de ATP e a enzima luciferase, através da emissão de luz que será lida pelo luminómetro.....	47

Figura 34 – Plano de controlo e análise microbiológica para a etapa de tiragem no processo de produção de espumantes na empresa Global Wines S.A., com referência aos pontos de recolha das amostras.	50
Figura 35 – Pontos de recolha de amostras, por esfregaço com zaragatoa de superfícies, para controlo microbiológico do processo de higienização em adega: A – escala; B – provadeira; C – interior do depósito; D – torneira do depósito.....	51
Figura 36 – Observação visual das placas inoculadas com as amostras em estudo, recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana. As amostras foram recolhidas através de esfregaço com zaragatoa de superfícies, após a higienização dos depósitos da adega.....	53
Figura 37 – Pontos de recolha de amostras, por esfregaço com zaragatoa de superfícies, para controlo microbiológico do processo de higienização no filtro de terras: A – interior do filtro de terras; B – saída de terras; C – entrada e saída do vinho no filtro de terras.	55
Figura 38 – Observação visual das placas de exposição com meio de cultura WLN para deteção de bolores e leveduras, colocadas durante 15 minutos junto ao ambiente do filtro de terras e posteriormente inoculadas a 35°C durante 48 horas.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Castas recomendadas na Região Demarcada do Dão. A negrito, as castas mais cultivadas na região, tendo em conta a área total de vinha plantada na região do Dão	5
Tabela 2 - Leveduras de alteração mais presentes no vinho.....	24
Tabela 3 – Resultados da amostragem antes e após a estabilização microbiológica dos vinhos tranquilos na Global Wines S.A.	45
Tabela 4 - Limites de aprovação e reprovação, da leitura de RLU pelo luminómetro Ensure Touch (Hygiena), recorrendo à Zaragatoa UltraSnap.	48
Tabela 5 – Controlo da higienização da linha de tiragem, com recurso ao teste de ATP em zaragatoa UltraSnap e respetiva leitura de RLU em luminómetro Ensure Touch. A tiragem decorreu durante 22 dias de produção (03.02.2023 a 09.03.2023).....	48
Tabela 6 – Resultados do estudo ao ambiente/ar da enchedora na etapa de tiragem da produção de vinhos espumantes na Global Wines S.A., recorrendo a placas de exposição.....	49
Tabela 7 – Resultados do controlo microbiológico da etapa de tiragem do processo de produção de espumantes na Global Wines S.A., recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana.	50
Tabela 8 – Resultados do controlo microbiológico do processo de higienização em operações de adega na empresa Global Wines S.A., recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana.	52
Tabela 9 – Controlo da higienização da linha de tiragem, com recurso ao teste de ATP em zaragatoa UltraSnap e respetiva leitura de RLU em luminómetro Ensure Touch...54	
Tabela 10 – Resultados do controlo microbiológico do processo de higienização no filtro de terras na empresa Global Wines S.A., recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana.	55

1. Introdução

1.1. Breve descrição do local de estágio

O estágio curricular, no âmbito da unidade curricular de Estágio, do Mestrado em Engenharia Alimentar da Escola Superior Agrária de Coimbra foi realizado no laboratório de Enologia da empresa Global Wines S.A., durante o período de 3 de janeiro a 30 de junho de 2023, com a duração aproximada de 1000 horas, tendo como tema de estágio “Controlo microbiológico na produção de vinhos: estudo de caso numa adega da região Demarcada do Dão”.

A Global Wines S.A., fundada em 1990 (na altura, com a designação Dão Sul), encontra-se localizada no concelho de Carregal do Sal (Figura 1), em plena Região Demarcada do Dão (DOC Dão), sendo actualmente a maior empresa produtora de vinhos tranquilos da região do Dão, com uma estimativa de 7.000.000 de garrafas engarrafadas e comercializadas por ano. Encontra-se presente nos dias de hoje em 5 continentes e em mais de 40 países (Global Wines, 2023).

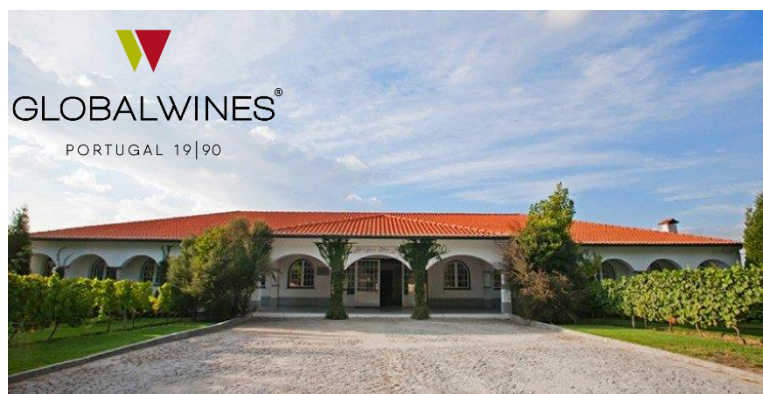


Figura 1 – Sede da Global Wines S.A., localizada no concelho de Carregal do Sal, em plena Região Demarcada do Dão (DOC Dão) e respetivo logótipo da empresa.

Com vinhas em várias regiões do país, a Global Wines S.A. apresenta um vasto portefólio de marcas reconhecidas e premiadas a nível nacional e internacional, com comercialização de uma gama diversificada de vinhos tranquilos (tintos, brancos e rosés), bem como vinhos espumantes, vinhos licorosos (Cabriz Ímpar e Moscatel), um vinho colheita tardia (Outono de Santar) e uma aguardante vínica velha (Aguardente Vinha do Contador).

O *ex-libris* da empresa é sem dúvida nenhuma a marca Cabriz (líder de vendas da região do Dão), contudo Casa de Santar, Paço dos Cunhas, Grilos (vinhos DOC Dão), Quinta do Encontro (DOC Bairrada), Herdade Monte da Cal (DOC Alentejo), Vinha

Maria (DOC Douro, DOC Vinho Verde, DOC Dão, IGP Lisboa e DOC Alentejo) e Astrolabium (DOC Vinho Verde e DOC Dão) são também marcas da Global Wines bastante apreciadas pelo mercado. De destacar também a marca Vinhos Rio Sol, com vinhos produzidos a partir das castas de uva da vinícola Rio Sol (Pernambuco, Brasil) e pertencente também à Global Wines (Figura 2).

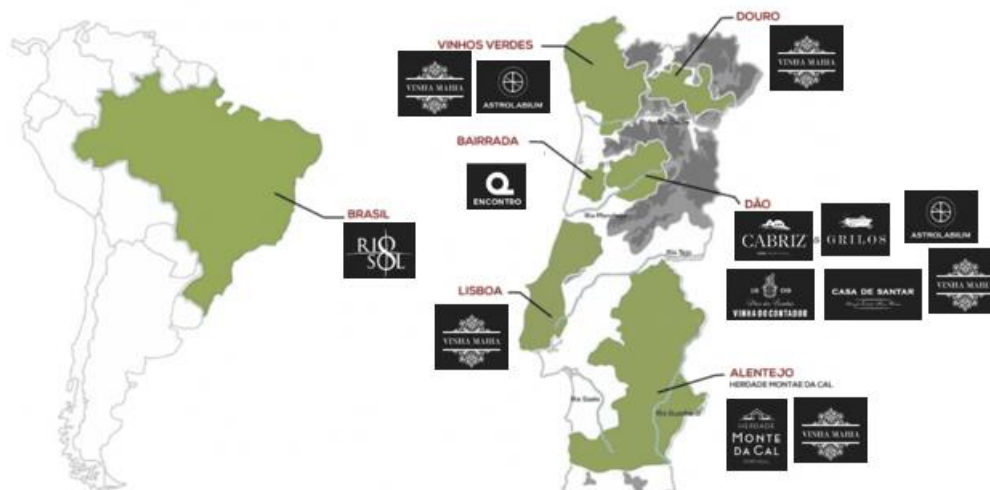


Figura 2 – Localização geográfica das várias regiões vinícolas que dão origem às marcas da Global Wines, reconhecidas a nível internacional (adaptado de Global Wines, 2023).

Para além da produção e comercialização de vinhos e espumantes, a empresa apostou nos últimos anos na vertente de enoturismo, com visitas guiadas às adegas do grupo, provas de vinhos bem como a aposta na gastronomia regional, com os restaurantes Quinta de Cabriz (em Carregal do Sal), Paço dos Cunhas (em Santar, no concelho de Nelas) e Quinta do Encontro (no concelho da Anadia, na região da Bairrada).

A Global Wines tem como principal política a valorização da qualidade do vinho produzido, procurando levar sempre em consideração as tendências do mercado e do sector e a opinião e preferências dos seus clientes e principais consumidores, de forma a garantir a qualidade e segurança alimentar do produto final, controlando todo o processo produtivo desde “a uva até à garrafa”.

Para a concretização deste pressuposto, a Global Wines aposta na procura contínua de melhorias a nível tecnológico e organizacional, sempre com o objetivo de garantir a adequação dos seus produtos ao mercado e tendo em conta a sustentabilidade e segurança do seu processo (Global Wines S.A., 2021a).

O Regulamento (CE) nº852/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios estipula, no seu artigo 5º, que todos os operadores do sector alimentar devem criar, aplicar e manter um processo ou processos permanentes baseados nos 7 princípios do HACCP. Tendo

como ponto de partida a legislação e garantindo a qualidade e segurança alimentar dos seus produtos, a Global Wines tem implementado no processo de produção um plano HACCP robusto e bem definido, com a monitorização constante e diária dos vários pontos críticos de controlo (PCC's) do processo, bem como as respetivas análises físico-químicas associadas ao controlo desses mesmos pontos críticos (Global Wines S.A., 2021b).

Procurando a melhoria de qualidade contínua, a empresa encontra-se neste momento certificada para a ISO 9001 bem como para a IFS Food, em todo o processo de produção dos vinhos e espumantes, desde à adega à linha de engarrafamento, para além de apostar na inovação e desenvolvimento dos seus produtos e marcas, tendo sido a primeira empresa do sector agroalimentar a implementar um NITEC (Núcleo de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico em Empresas), no ano de 2003 (19|90 Premium Wines, 2023).

1.2. Região Demarcada do Dão

Com a sua criação a remontar ao início do século XX (18 de setembro de 1908), a Região Demarcada do Dão foi a primeira região do país a produzir vinhos não licorosos a ser demarcada e regulamentada (CVR Dão, 2023a).

Situada na zona da Beira Alta, no centro norte de Portugal, a Região Demarcada do Dão é cortada pelos rios Dão, Mondego e Alva e circundada por um conjunto de serras (Serra do Caramulo, Nave, Açor, Buçaco e Estrela), que desempenham um papel de proteção para esta região das massas húmidas do litoral e dos fortes ventos continentais, contribuindo assim para a obtenção de vinhos de qualidade, devido às condições geográficas favoráveis (CVR Dão, 2023c).

De acordo com a Portaria n.º 246/2014, a Região Demarcada do Dão divide-se em 7 sub-regiões (Figura 3), ocupando uma área total de cerca de 376.000 hectares (IVV, 2021b):

1. Sub-região de Alva (concelhos de Oliveira do Hospital, Tábua e Arganil);
2. Sub-região de Besteiros (concelhos de Mortágua, Santa Comba Dão e Tondela);
3. Sub-região de Castendo (concelhos de Penalva do Castelo e Sátão);
4. Sub-região da Serra da Estrela (concelhos de Gouveia e Seia);
5. Sub-região de Silgueiros (concelho de Viseu)
6. Sub-região de Terras de Azurara (concelho de Mangualde);
7. Sub-região de Terras de Senhorim (concelhos de Carregal do Sal e Nelas), onde se localiza a empresa Global Wines S.A.



Figura 3– Localização geográfica da Região Demarcada do Dão e respetivas sub-regiões (adaptado de (Cipriano, sem data).

Algumas características do solo como a alta taxa de infiltração, a baixa retenção de água, o pH ácido do solo e terreno essencialmente granítico contribuem para as boas condições de prática de viticultura nesta região. O clima na região do Dão sofre simultaneamente a influência vinda do Oceano Atlântico e do Interior do país, por isso os invernos são frios e chuvosos enquanto os verões são quentes e secos (CVR Dão, 2023c).

Aos vinhos produzidos na região é atribuída a designação de Denominação de Origem Controlada (DOC) – DOC Dão (Figura 4). Esta designação é normalmente atribuída a vinhos de uma determinada região geograficamente delimitada e condicionada a um conjunto de regras específicas da legislação, como as características do solo, tempo de estágio do vinho, as práticas de vinificação, o teor alcoólico e as castas recomendadas.



Figura 4 – Selo de garantia de vinho DOC Dão, após certificação atribuída pela Comissão Vitivinícola Regional do Dão (de acordo com o Decreto-Lei nº94/2012)

Como tal, para produção de vinhos na Região do Dão (DOC Dão) as castas recomendadas dividem-se em castas tintas e castas brancas (Tabela 1).

Tabela 1 – Castas recomendadas na Região Demarcada do Dão (CVR Dão, 2023b), A negrito, as castas mais cultivadas na região, tendo em conta a área total de vinha plantada na região do Dão (IVV, 2021b)

Castas tintas	Castas brancas
Jaen / Mencia (22,6%), Touriga Nacional (21,9%), Aragonez / Tinta-Roriz / Tempranillo (18%), Alfrocheiro / Tinta Bastarda (6,2%), Baga (4,5%), Rufete / Tinta-Pinheira (3,6%), Trincadeira / Tinta Amarela / Trincadeira-Preta (1,2%), Alicante-Bouchet, Alvarelhão / Brancelho, Bastardo / Graciosa, Camarate, Castelão, Cornifesto, Monvedro, Moreto, Mourisco, Pilongo, Tinta-Carvalha, Touriga-Fêmea, Tinto-Cão	Encruzado (4,9%), Bical / Borrado das Moscas (3,8%), Malvasia-Fina (2,9%), Fernão Pires / Maria Gomes (1,6%), Alicante-Branco, Arinto / Perdernã, Arinto-do-Interior, Barcelo, Branda, Cerceal-Branco, Douradinha, Gouveio, Luzidio, Malvasia-Rei, Moscatel-Galego-Branco / Muscat-à-Petits-Grains, Rabo-de-Ovelha, Semillon, Síría / Roupeiro / Códega, Tamarez / Molinha, Verdial-Branco, Terrantez, Uva-Cão

Em termos de produção anual de vinho na região, na última campanha de 2022-2023 foram produzidos cerca de 280.000 hl de vinho (4,08% da produção total de vinho no país), dos quais cerca de 226 mil dizem respeito à produção de vinhos tintos e/ou rosés (Figura 5). Verificam-se alterações significativas ao longo dos anos na produção total anual de vinho, muito devido à alteração frequente das condições ótimas para vinificação, quer em termos climáticos, económicos ou de condições do solo (IVV, 2021a).

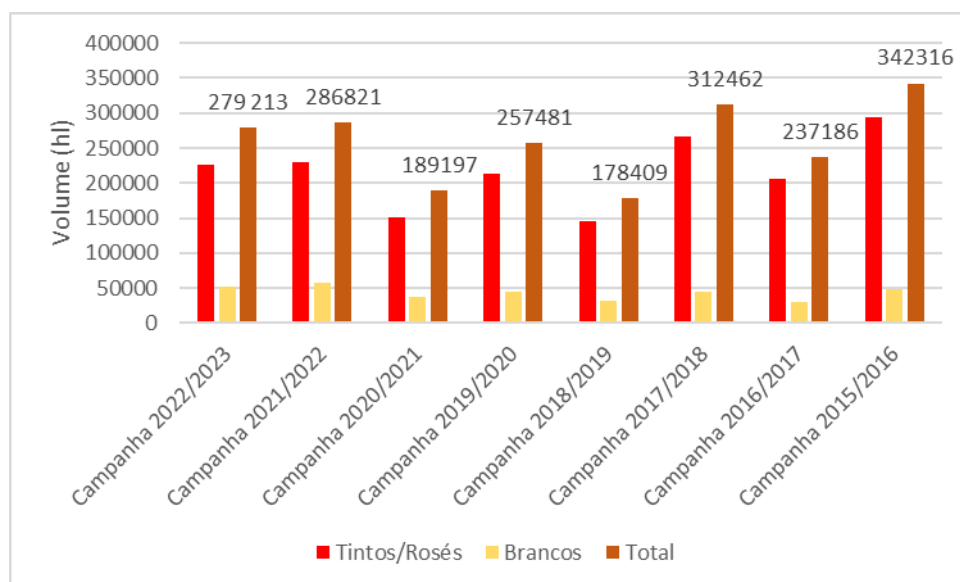


Figura 5 – Evolução da produção de vinho (em hl) na Região Demarcada do Dão, entre 2015 e 2023 (IVV, 2021a).

2. Objetivos do estágio

Subordinado ao tema “Controlo microbiológico na produção de vinhos: estudo de caso numa adega da região Demarcada do Dão”, o principal objetivo deste estágio foi garantir a eficácia dos métodos analíticos microbiológicos implementados no processo de produção de vinhos engarrafados com vista à correta monitorização dos processos e otimização dos mesmos.

Nesse sentido, numa fase inicial do estágio, pretendeu-se adquirir e aplicar conhecimentos teóricos e práticos no âmbito da rotina diária de análises físico-químicas e microbiológicas do laboratório da Global Wines S.A., realizadas de acordo com o Plano de Controlo e Análise em vigor na empresa, no sentido de auxiliar o departamento de Enologia e Produção, mais concretamente a equipa do laboratório de Enologia da Global Wines S.A.

Com o intuito de comprovar a eficácia dos vários processos de estabilização microbiológica no decorrer do processo de produção dos vinhos, comparou-se resultados microbiológicos de amostras obtidas antes e após a etapa de filtração por membranas e/ou tratamento térmico (engarrafamento a quente) no processo de produção de vinhos brancos, rosés e tintos.

O período de estágio coincidiu com a etapa de tiragem que decorreu entre fevereiro e março de 2023, relativa ao processo de produção de vinhos espumantes. Agindo de acordo com o que se encontra referenciado no Plano de Controlo e Análise da empresa, procedeu-se ao controlo microbiológico desta etapa.

A higienização na indústria alimentar é imprescindível para a manutenção da qualidade e segurança alimentar do produto final, impedindo contaminações desnecessárias. Na indústria vinícola isso não é exceção. Para possibilitar a otimização do processo de higienização implementado na empresa Global Wines S.A., foram realizadas análises microbiológicas e testes experimentais com recurso a métodos de bioluminescência (deteção de resíduos de ATP) após a higienização de depósitos em adega e após a higienização dos equipamentos de filtração utilizados no processo (filtro de terras).

3. O vinho

Desde os primórdios da humanidade, o vinho tem vindo a desempenhar um papel de relevo em quase todas as civilizações, havendo registos da sua produção e consumo nas civilizações egípcia, grega e romana (Alpuim, 1997; Johnson, 1989).

Produzido a partir de uvas provenientes de castas de *Vitis vinifera* L., o vinho faz parte da vida social e cultural das sociedades até aos tempos atuais (ASAE, 2016). São também cientificamente reconhecidas as propriedades benéficas para a saúde do organismo humano do consumo moderado de vinho (Tomera, 1999).

De acordo com a legislação em vigor (Regulamento (CE) Nº 1308/2013, do Parlamento Europeu e do Conselho), pode definir-se vinho como “o produto obtido exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mostos de uvas”.

O vinho é o resultado de um processo bioquímico complexo, que começa na vindima, continua até à fermentação alcoólica e malolática (no caso de vinhos tintos), estágio e culmina no seu engarrafamento, sendo um produto natural, fruto de reações bioquímicas, que se iniciam durante a maturação da uva e se estendem até ao engarrafamento (Romano, 2003).

Todos os vinhos têm de estar em conformidade com os vários parâmetros analíticos, estabelecidos na legislação europeia e portuguesa e disponíveis para consulta pelo Instituto da Vinha e do Vinho, I.P. (IVV) e pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV).

Segundo últimos dados divulgados pela OIV, a produção mundial de vinho em 2022 situou-se em 258 milhões de hectolitros (Figura 6), sendo 6,8 milhões de hectolitros (2,6% da produção mundial e décimo país no *ranking* mundial) respeitantes à produção de vinho em Portugal.

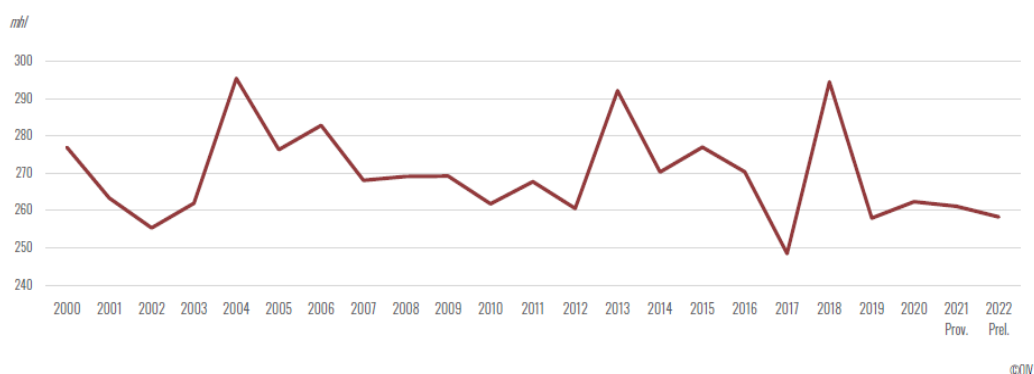


Figura 6 - Evolução da produção mundial de vinho (excluídos sumos e mostos) (OIV, 2023)

No que toca ao consumo desta bebida alcoólica, houve um pequeno decréscimo no ano passado (-1%), com uma estimativa de 232 milhões de hectolitros de vinho consumidos a nível mundial (Figura 7). Este decréscimo deveu-se em parte ao aumento dos preços de produção e distribuição de produtos alimentares, associado à crise energética e guerra na Ucrânia. No nosso país, em 2022, a estimativa de consumo de vinho foi de 6,0 milhões de hectolitros, correspondente a 3% do consumo mundial, ocupando a décima posição no *ranking* mundial e o sétimo lugar no *ranking* europeu, atrás de países como o Reino Unido, Itália, França ou Alemanha (OIV, 2023).

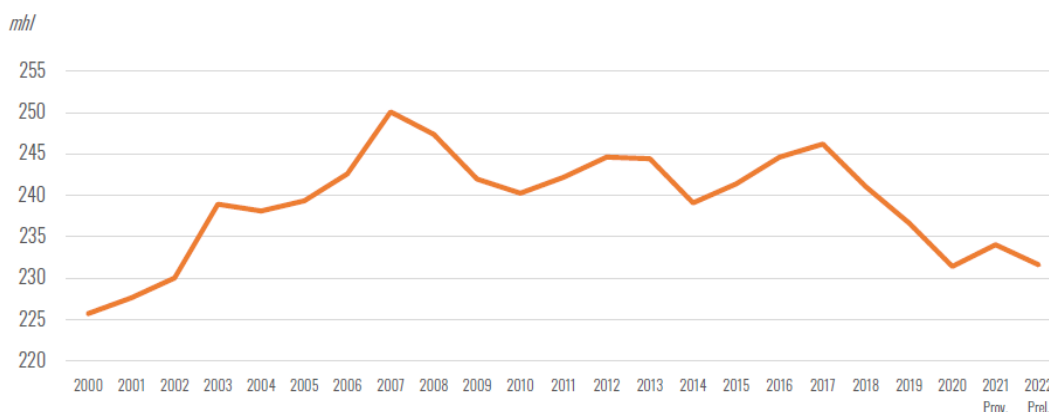


Figura 7 - Evolução do consumo mundial de vinho (OIV, 2023)

Na generalidade, os vinhos podem ser classificados como tranquilos (vinho tinto, branco e rosé), licorosos (vinho do Porto, vinho Madeira e moscatel) e espumantes naturais, gaseificados e frisanes. Os vinhos licorosos, generosos ou fortificados são obtidos quando a fermentação alcoólica é interrompida pela adição de aguardente ou álcool vínico, sendo que ficará mais ou menos doce dependendo do momento de interrupção ou da uva que se está a utilizar na produção do licoroso.

No nosso país, existe um tipo de vinho específico que devido à sua elevada acidez pode ser considerado pertencente a uma categoria à parte - Vinho Verde (produzido a partir de uvas tintas ou brancas) (ASAE, 2016).

3.1. Composição físico-química do vinho

A composição físico-química do vinho difere da composição físico-química do mosto e/ou da uva, devido às alterações bioquímicas ocorridas nos processos de fermentação. No mosto, por exemplo, a glucose e a frutose (Figura 8) são os açúcares fermentescíveis mais presentes, sendo posteriormente utilizados pelas leveduras para realizar a fermentação alcoólica, transformando o açúcar disponível em etanol (cerca de 90% do açúcar fermentescível), com libertação de dióxido de carbono (Alpuim, 1997).

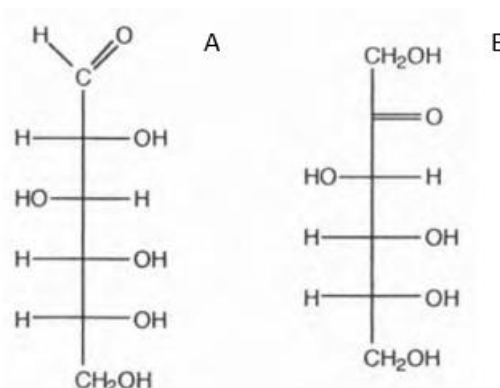


Figura 8 – Principais açúcares presentes na uva e no mosto e passíveis de sofrerem fermentação alcoólica. A glucose (A) é uma aldo-hexose e a frutose (B) é uma ceto-hexose (Alpuim, 1997).

Sendo assim, o etanol é, depois da água, o constituinte maioritário do vinho, dos mais de 600 compostos químicos que compõem a sua composição química (Alpuim, 1997) (Figura 9). O teor de etanol varia entre 9% e 17%vol. nos vinhos tranquilos e é normalmente superior a 17%vol. nos vinhos licorosos.

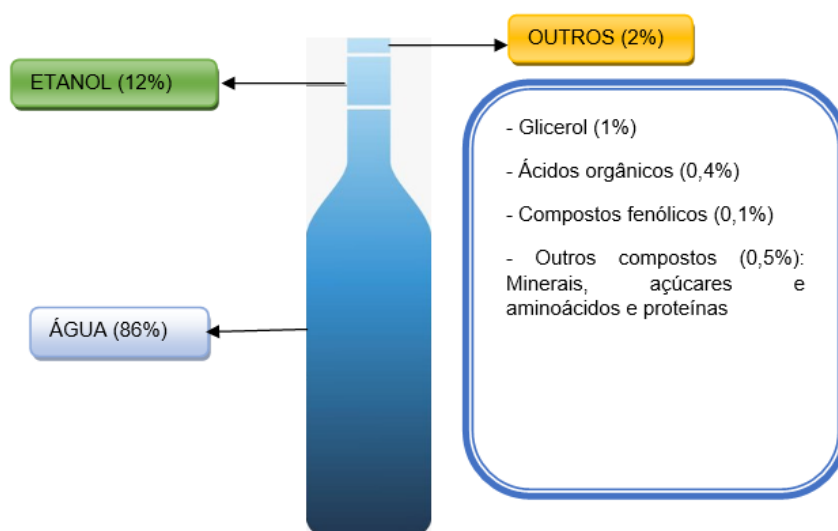


Figura 9 – Principais componentes do vinho (adaptado de Nemzer et al., 2021)

O terceiro composto em abundância no vinho é o glicerol, que se forma durante a fermentação alcoólica (produto secundário mais presente). A sua concentração no vinho varia entre 6 e 15 g/L, sendo também um bom fator de qualidade, ao ser responsável por conferir macieza ao vinho.

Durante a fermentação alcoólica, são também produzidos alguns compostos secundários, que se encontrarão posteriormente no vinho em menores concentrações que o etanol (principal produto das reações químicas no decorrer da atividade das leveduras) como é o caso dos ácidos succínico, acético e pirúvico, o acetaldeído e os poliólcoois (Alpuim, 1997).

A concentração de ácido tartárico, ácido málico e ácido láctico também varia da uva e mosto para o vinho obtido a partir destes. O ácido tartárico é o principal ácido presente (2 a 5 g/L), com a sua concentração a expressar a acidez total do vinho. É um ácido forte, resistente à ação de bactérias e só se encontra naturalmente presente na uva e no vinho. Por outro lado, o ácido málico, abundante na uva não madura, apresenta uma concentração decrescente da uva e mosto para o vinho, devido à maturação da uva, à degradação deste ácido pelas leveduras na fermentação alcoólica (transformação de ácido málico em pirúvico) e à utilização do mesmo pelas bactérias lácticas numa possível fermentação malolática, dando origem ao ácido láctico (ácido não presente inicialmente na uva).

Regista-se também a presença de alguns iões importantes para a composição química do vinho: os catiões potássio (K^+) (0,5 a 2,0 g/L), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) (50 a 150 mg/L) e sódio (Na^+) (cerca de 10 mg/L) e os aniões sulfito (SO_3^{2-}), bissulfito (HSO_3^-), carbonato (CO_3^{2-}), bicarbonato (HCO_3^-), fosfato (PO_4^{3-} , 20-160 mg/L em brancos e 50 a 300 mg/L em tintos), sulfato (SO_4^{2-} , 150 a 300 mg/L) e o cloreto (Cl^- , 50 mg/L). Em pequenas concentrações, denota-se a presença dos iões lítio (Li^+), ferro (Fe^{3+}) e cobre (Cu^{2+}).

Os compostos fenólicos (antocianinas, flavonas, ácidos fenólicos e taninos) e os polifenóis são também uma parte importante da composição química, sendo responsáveis pela cor do vinho (Alpuim, 1997).

3.2. O processo de vinificação

3.2.1. Produção de vinhos tranquilos

O processo de produção de vinhos tranquilos é descrito de seguida tendo por base o fluxograma de vinhos tranquilos comum a vinhos brancos, rosés e tintos, verificado *in loco* na empresa Global Wines S.A. pela equipa de HACCP e documentado no Manual de Segurança Alimentar da empresa (Global Wines S.A., 2021b) (Figura 10, Figura 11).

A vinificação, quer em brancos quer em tintos, inicia-se com a vindima (em meados de setembro e outubro). Após esta ocorrer, a uva é enviada para as adegas da empresa, identificada e pesada segundo a sua origem (casta e estado fitossanitário) e local e data da colheita (dia, hora), com respetivo registo dos dados obtidos (Figura 10 - 1).

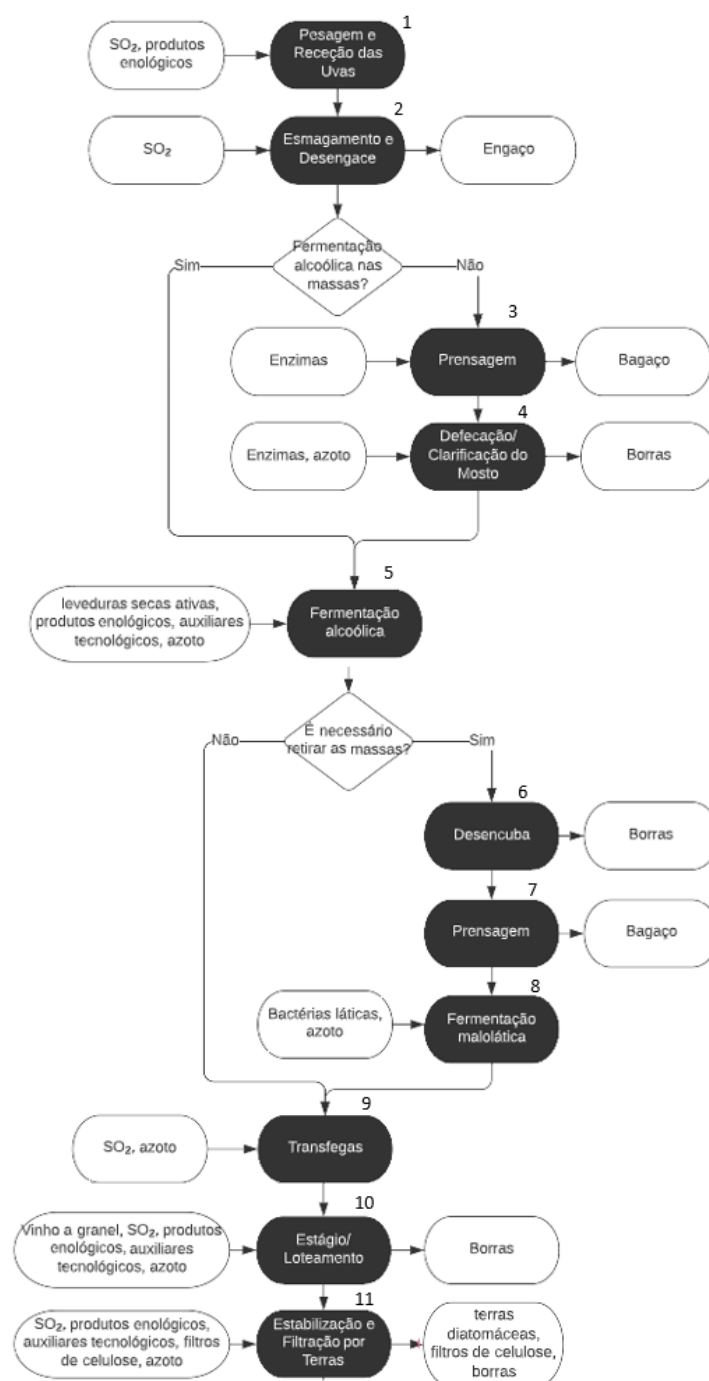


Figura 10 – Fluxograma de produção de vinhos tranquilos (brancos, rosés e tintos) na empresa Global Wines S.A., com as etapas que decorrem na zona da adega (Etapas 1-11) (adaptado de (Global Wines S.A., 2021b)).

De seguida dá-se início ao processo de desengace, que consiste na separação do engaço (parte lenhosa dos bagos), com consequente esmagamento da uva, com libertação do respetivo sumo contido na polpa e dispersão das leveduras indígenas e enzimas no mosto, recorrendo a um desengaçador/esmagador (Figura 10 – 2).

Se a fermentação alcoólica não ocorrer na presença de massas (na produção da maior parte dos vinhos brancos, por exemplo), é necessário inicialmente proceder à prensagem do mosto, seguindo-se o seu arrefecimento, sedimentação e clarificação (Figura 10 – 3,4). Os compostos mais pesados acabam, por ação da gravidade após algum tempo, por sedimentar e ficar depositados no fundo do depósito/cuba onde se encontram, levando à existência de duas fases distintas: as borras no fundo do depósito (retiradas no fim da etapa) e a parte mais líquida do mosto, na superfície do depósito e acima das borras, que seguirá para fermentação.

De referir que o mosto é sulfitado (com a adição de SO_2) até ser fermentado (Figura 10 – 1,2), para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis e garantir que as leveduras envolvidas no processo de fermentação são as desejáveis.

No caso de vinhos tintos, a fermentação alcoólica (Figura 10 – 5) ocorre na presença de massas. Para poder efetuar-se uma fermentação controlada, adicionam-se leveduras secas ativas (da espécie *Saccharomyces cerevisiae*) e nutrientes (nomeadamente, compostos azotados), que permitam garantir o metabolismo das leveduras durante todo o processo fermentativo. Este processo é controlado pela equipa da adega, com a constante medição da temperatura e da massa volúmica do mosto.

Dando por terminada a fermentação alcoólica, o vinho branco é transferido para uma cuba de inox ou barrica, onde estará em estágio até ser dada a ordem para engarrafamento ou loteamento (Figura 10 – 9), sendo frequentemente sulfitado, com o objetivo de estabilizar o vinho e evitar a perda de qualidade.

Na produção de vinhos tintos, é necessário proceder inicialmente à desencuba (Figura 10 – 6), retirando as borras decorrentes da fermentação alcoólica ocorrida, ao qual se segue uma prensagem (Figura 10 – 7), de forma a retirar totalmente todas as partículas sólidas resultantes das etapas anteriores (bagaço), que poderão ser utilizadas para produção de aguardante bagaceira, recorrendo à sua destilação. Promove-se a ocorrência da fermentação malolática (Figura 10 – 8), com a adição de bactérias lácticas (*Oenococcus oeni*) e nutrientes (sob a forma de azoto). Esta etapa permite tornar o vinho mais macio, visto que o ácido málico apresenta um caráter mais ácido que o ácido láctico. O vinho tinto está assim pronto para seguir para estágio, quer em cubas inox ou em barricas de madeira, dependendo do perfil de vinho pretendido (Figura 10 – 9).

O vinho é periodicamente sulfitado, sendo realizada uma amostragem mensal, para efeitos de análise e prova sensorial, de forma a controlar a sua qualidade físico-química e organolética ao longo do tempo, até ser loteado (Figura 10 – 10), tendo em conta as ordens de trabalho definidas pela equipa de Enologia.

Após aprovação para engarrafamento de um determinado lote de vinho, por parte do enólogo responsável da adega, procede-se a uma primeira filtração em adega recorrendo a um filtro de terras (Figura 10 – **11**). Na maioria das vezes são usadas terras diatomáceas que formam uma camada filtrante, onde ficam retidas as partículas sólidas do vinho, promovendo uma maior limpidez do mesmo e redução da sua turbidez.

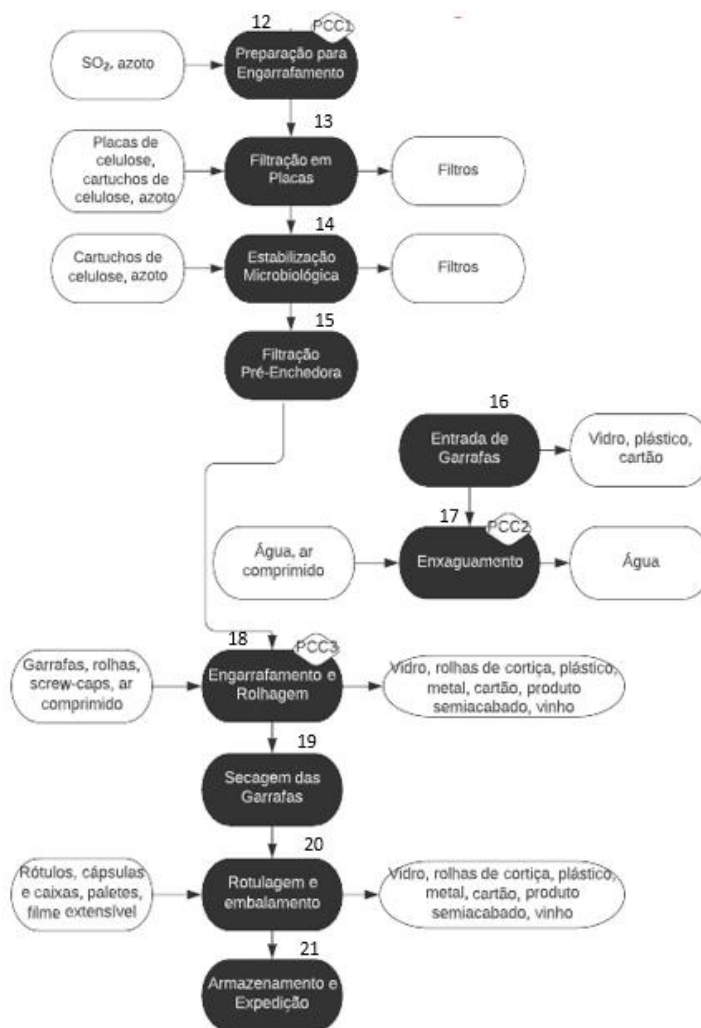


Figura 11 – Fluxograma de produção de vinhos tranquilos (brancos, rosés e tintos) na empresa Global Wines S.A., com as etapas que decorrem na zona de engarrafamento (Etapas 12-21) (adaptado de (Global Wines S.A., 2021b)).

Antes da etapa de engarrafamento, são adicionados produtos enológicos ao vinho, de acordo com uma ordem de trabalho interna específica para cada perfil de vinho. A intervenção da equipa do laboratório nesta fase é essencial, ao realizar todas as análises físico-químicas solicitadas antes do engarrafamento (Figura 11 - **12**).

Segue-se uma segunda filtração, neste caso, recorrendo a um filtro de placas ou módulos (Figura 11 – **13**), com o objetivo de clarificar o vinho a engarrafar (reduzindo a sua turbidez a um valor abaixo de 5 NTU).

Antes de proceder ao engarrafamento do vinho, é necessário garantir a sua estabilidade microbiológica. Como tal, recorre-se a uma pasteurização no caso de engarrafamento de vinhos tintos ou faz-se passar os restantes vinhos a engarrafar por um filtro de membranas (Figura 11 – 14), com o objetivo de reter o microbioma existente e impedir a ocorrência de alterações organoléticas no produto final, o que levaria a uma perda da qualidade do mesmo.

Por fim, dá-se início ao engarrafamento com uma filtração pré-enchedora (Figura 11 – 17), enchimento, rolhagem na rolhadora (quer com rolha ou com *screw-cap*, dependendo da ordem de trabalho definida pelo cliente para o vinho a engarrafar) e posterior secagem das garrafas numa secadora (Figura 11 – 18,19).

O processo de produção termina com a rotulagem, capsulagem e embalagem das garrafas engarrafadas, com a marcação do lote via laser (Figura 11 – 20), seguindo as mesmas para o armazém, onde ficarão armazenadas até a sua possível expedição para o mercado (Figura 11 – 21).

Foram definidos ao longo do processo de produção de vinhos tranquilos, pela equipa de Segurança Alimentar da empresa, três pontos críticos de controlo:

1) **PCC Nº1** - Preparação para Engarrafamento (Figura 11 – 12):

Perigo: Excesso de SO₂¹;

Monitorização: Determinação do SO₂ total, através de análises laboratoriais, confrontando com os limites legais em vigor;

Responsável pelo Controlo: Equipa de Enologia (laboratório)

¹O SO₂ é considerado um alergénio pela Organização Mundial de Saúde, estando legislado os limites máximos permitidos de SO₂ a adicionar a um alimento ou bebida. A legislação obriga também à referência da sua utilização na rotulagem do produto, com a designação “Contém sulfitos”.

2) **PCC Nº2** – Enxaguamento (Figura 11 – 17)

Perigo: Presença de vidros partidos derivados da quebra de garrafas na despaletização ou durante o manuseamento das paletes;

Monitorização: Inspeção visual das paletes de garrafas à receção e antes de entrar na linha;

Responsável pelo Controlo: Equipa de Produção (Linha de engarrafamento)

3) **PCC Nº3** – Engarrafamento e Rolhagem (Figura 11 – 17)

Perigo: Presença de vidros no interior da garrafa por quebra de garrafas durante o engarrafamento e rolhagem;

Monitorização: Inspeção visual à garrafa a engarrafar e rolhar;

Responsável pelo Controlo: Equipa de Produção (Linha de engarrafamento)

3.2.2. Produção de vinho espumante

Segundo o Regulamento (UE) nº1308/2013, o vinho espumante de qualidade é definido como o “produto obtido por primeira ou segunda fermentação alcoólica de uvas frescas, de mosto de uvas, ou de vinho, que liberta, quando se procede à abertura do recipiente, dióxido de carbono proveniente exclusivamente da fermentação, e que apresenta, quando conservado à temperatura de 20°C em recipientes fechados, uma sobrepressão, devida ao dióxido de carbono em solução, igual ou superior a 3,5 bar”.

O processo de produção de vinho espumante na empresa Global Wines S.A. (Figura 12) é realizado segundo o método tradicional (ou champanhês) que se traduz pela ocorrência da segunda fermentação alcoólica em garrafa.

Para a obtenção de um bom vinho espumante é indispensável a seleção, por parte do enólogo responsável, de um vinho base de excelente qualidade (Figura 12 – 1), tendo como referência as suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais (Liger-Belair et al., 2012).

O vinho base pode ser definido do ponto de vista legal como o “mosto de uvas, o vinho ou a mistura de mostos de uvas e/ou vinhos com diferentes características, destinados à preparação de um tipo determinado de vinho espumante” (Regulamento (UE) nº1308/2013) e cujo título alcoométrico volúmico adquirido mínimo deverá ser de 9 %vol. (Portaria Nº 238-A/2011).

Há que garantir que este vinho apresente uma baixa concentração de SO₂ (SO₂ total inferior ou igual a 100 mg/L) uma vez que este composto é inibidor de atividade microbiana, indispensável na produção de espumante. É também importante que este apresente uma boa estabilidade proteica e tartárica.

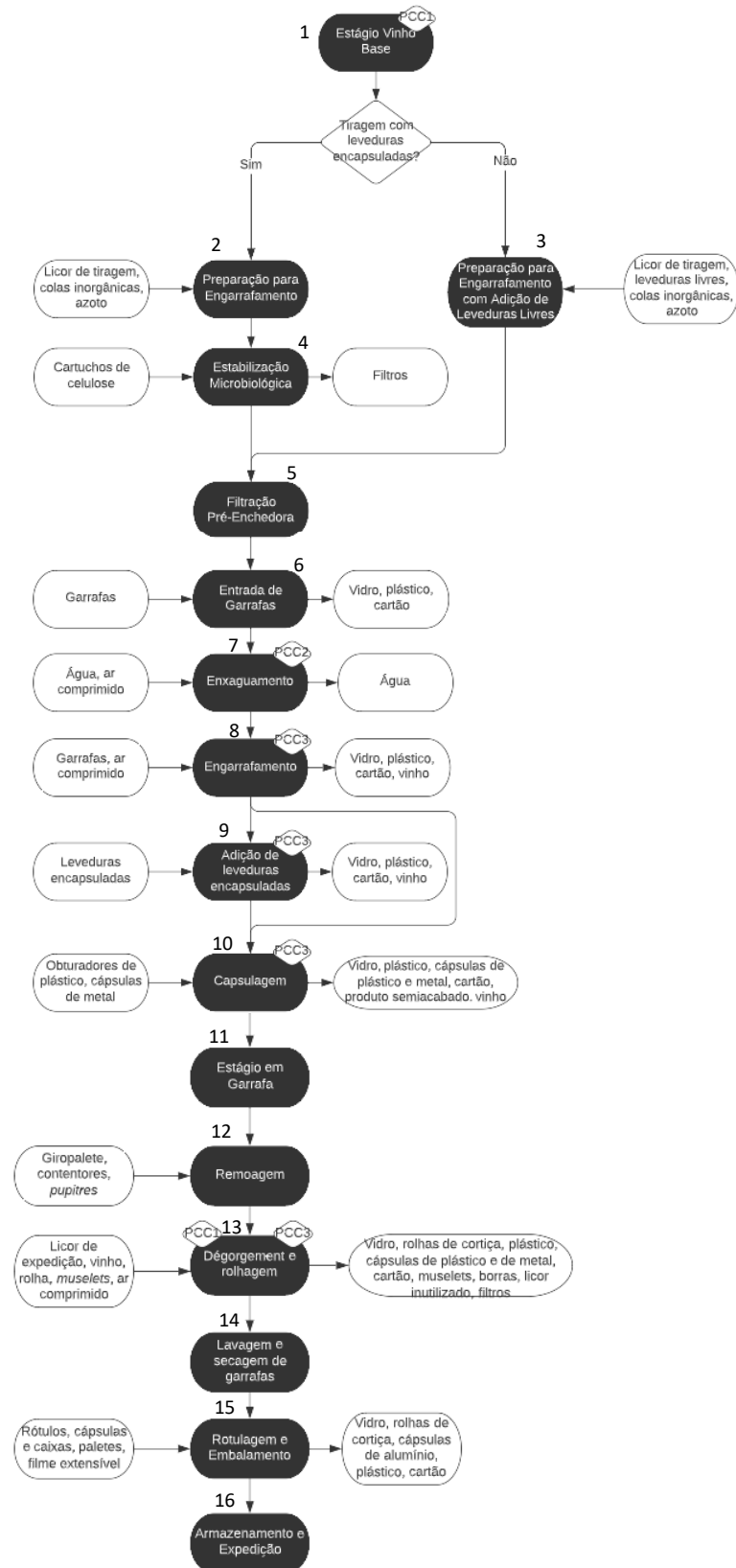


Figura 12 – Fluxograma de produção de vinhos espumantes na empresa Global Wines S.A. (adaptado de (Global Wines S.A., 2021b)).

Após a seleção do vinho base, procede-se à preparação para a tiragem (Figura 12 – 2,3). Esta difere no tipo de leveduras a utilizar: tiragem com recurso a leveduras encapsuladas ou tiragem com recurso a leveduras livres (Figura 13).

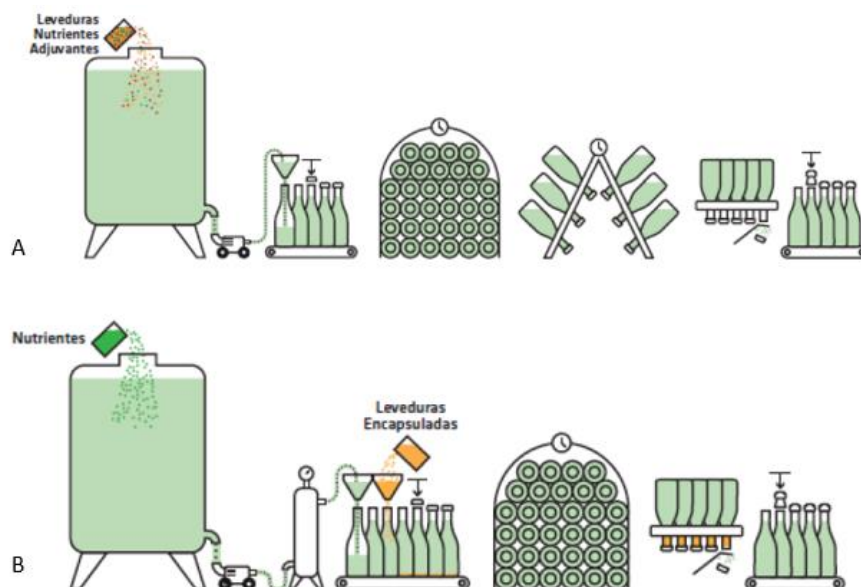


Figura 13 – Processo de produção de vinho espumante: A – Tiragem com leveduras livres; B – Tiragem com leveduras encapsuladas (Centeno, 2014).’

Quando a etapa de tiragem ocorre com leveduras encapsuladas (Figura 13 – B) é adicionado, inicialmente ao vinho base, o licor de tiragem (Figura 12 – 2). Este licor, de grande importância no arranque e no sucesso da segunda fermentação e do futuro vinho espumante, é frequentemente composto por vinho base, com adição de sacarose, com a quantidade necessária para a pressão e teor alcoólico pretendido, e alguns nutrientes, nomeadamente compostos azotados e vitaminas (tiamina a 0,3 mg/L e fosfato de amónio), permitindo assim as condições necessários para a futura fermentação em garrafa.

É necessário proceder posteriormente à estabilização microbiológica do vinho base (Figura 12 – 4), no filtro de membranas de porosidade 0,45µm, com o objetivo de assegurar a ausência de qualquer microrganismo que pudesse colocar em causa o sucesso da segunda fermentação, levada a cabo pelas leveduras adicionadas nesta etapa (leveduras encapsuladas numa “cápsula” de alginato). Para além disto, pretende-se evitar a turvação do vinho durante a fermentação alcoólica em garrafa (Proenol, 2020).

Após a estabilização microbiológica, seguida de uma filtração pré-enchedora (Figura 12 – 5), o vinho base é adicionado às garrafas previamente enxaguadas (Figura 12 – 6,7,8), com posterior inoculação de leveduras encapsuladas (Figura 12 – 9), introduzidas diretamente na garrafa através da utilização de uma doseadora sendo

deste modo eliminada a etapa de preparação do inóculo. Para além disto recorrer a leveduras encapsuladas evita a necessidade de recorrer à etapa de remoagem, visto que a inversão da garrafa é suficiente para que em poucos segundos as esferas sedimentem no gargalo (Proenol, 2020).

No caso da etapa de tiragem ocorrer com leveduras livres (Figura 13 – A), é adicionado ao vinho base, para além do licor de tiragem acima referido, uma determinada quantidade de leveduras livres previamente hidratadas (normalmente estirpes de *Sacharomyces cerevisiae*) (Figura 12 – 3), de acordo com uma ordem técnica definida para a obtenção de vinhos espumantes de qualidade com características particulares, sendo posteriormente realizado o respetivo enchimento em garrafas previamente enxaguadas (Figura 12 – 7,8).

Ter em atenção que toda a linha de enchimento, na etapa de tiragem, deverá ser previamente submetida a uma higienização rigorosa para evitar qualquer tipo de contaminações que ponham em causa o sucesso do processo.

Após o enchimento e/ou introdução das leveduras encapsuladas, as garrafas são devidamente seladas com um obturador de plástico e uma cápsula de metal, com capacidade para suportar a futura pressão exercida na garrafa, bem como evitar perdas de CO₂ (Figura 12 – 10).

As garrafas seguem de seguida para estágio em cave (Figura 12 – 11), que pode durar entre vários meses a alguns anos, dependendo das características do vinho espumante de qualidade a produzir. Estas são colocadas na horizontal para garantir uma grande superfície de contacto entre as leveduras e o vinho, aumentando assim a eficácia da segunda fermentação.

Ao longo do tempo em que decorre a segunda fermentação em garrafa é feito um controlo rigoroso, por parte da equipa da adega, da temperatura da cave, bem como da sobrepressão com recurso a um afrómetro de cápsula. O contributo do laboratório nesta fase é imprescindível, através da realização de análises físico-químicas aquando do fim da segunda fermentação, bem como no momento imediatamente anterior ao *dégorgement*.

Antes de proceder à fase de *dégorgement*, as garrafas são colocadas em pupitres (estruturas de madeira em forma triangular), no caso de uma remoagem manual, ou em giropaletes (remoagem mecânica) (Figura 12 – 12). Este processo consiste na rotação lenta e invertida da garrafa, com o objetivo de os sedimentos contidos (resíduos da segunda fermentação) irem descendo progressivamente para o gargalo e aí se acumularem para facilitar a etapa seguinte.

As garrafas seguem então para a zona de engarrafamento para dar início à etapa de *dégorgement* (Figura 12 – 13). O gargalo da garrafa é inicialmente congelado,

formando um cubo de gelo que, sob o efeito da pressão interna na garrafa, leva à expulsão conjunta da cápsula, do obturador de plástico e do depósito de leveduras. É importante que esta etapa seja realizada a baixas temperaturas, para evitar a perda excessiva do dióxido de carbono dissolvido no líquido.

A adição do licor de expedição, composto normalmente por vinho de espumante base com açúcares (sob a forma de sacarose), é uma das etapas cruciais após o *degorgement*. A garrafa de espumante perdeu entretanto algum do seu volume com a remoção das leveduras e resíduos da segunda fermentação e é necessário colmatar esta diferença. Para além disto, o licor de expedição, através da quantidade de açúcar presente, tem a função de estabelecer o grau de doçura do vinho espumante pretendido, determinando assim a sua classificação (Figura 14):



Figura 14 – Classificação dos vinhos espumantes, tendo em conta o teor de açúcares (adaptado de Reg. (CE) nº 607/2009, Anexo XIV - Parte A)

Por fim e, após o atesto com o licor de expedição, a garrafa é rolhada, adiciona-se o *muselet* (Figura 12 – 13), é lavada e secada (Figura 12 – 14) e procede-se à sua posterior rotulagem, capsulagem (com cápsula de alumínio) e embalagem (Figura 12 – 15).

As garrafas seguem então para o armazém, onde ficarão armazenadas até a sua ordem de expedição para o cliente (Figura 12 – 16).

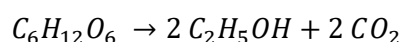
O processo de produção de vinhos espumantes na empresa Global Wines S.A. tem em comum com o processo de produção de vinhos tranquilos os pontos críticos de controlo, no que toca à Segurança Alimentar, já referenciados no capítulo 3.2.1. Como tal, serão somente aqui referidas as etapas em que estes ocorrem no processo de produção de espumantes:

- a) **PCC1** – Estágio Vinho Base (Figura 12 – 1) e *Dégorgement* (Figura 12 – 13);
- b) **PCC2** – Enxaguamento (Figura 12 – 7) na etapa de tiragem;
- c) **PCC3** – Engarrafamento e Capsulagem (Figura 12 – 8,9,10) na etapa de tiragem e *Dégorgement* e Rolhagem (Figura 12 – 13).

4. A microbiologia ao serviço da produção de vinhos

4.1. Fermentação alcoólica e malolática

A fermentação alcoólica é a etapa decisiva para a transformação do mosto em vinho. É nesta etapa que a atividade das leveduras atinge o seu pico, ao converterem os açúcares fermentescíveis (glucose e frutose) em etanol, com libertação de gás carbónico (Jackson, 2008; Lambrechts & Pretorius, 2000; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003; Zamora, 2009). A reação química envolvida neste processo fermentativo pode ser descrita como:



(com produção de energia sob a forma de 2 moléculas de ATP)

A fermentação alcoólica (Figura 15) pode ser dividida em três etapas principais, tendo em conta as reações químicas ocorridas e os produtos da reação obtidos:

I) Glicólise – Nesta etapa, uma molécula de hexose (glucose ou frutose) forma duas moléculas de ácido pirúvico ou piruvato. Dá-se a redução para NADH do aceitador de eletrões NAD^+ , com a formação de 2 moléculas de ATP.

II) Descarboxilação - O piruvato é inicialmente convertido em acetaldeído, um composto intermédio, pela enzima piruvato descarboxilase, levando à libertação de dióxido de carbono.

III) Regeneração do NAD^+ - O acetaldeído é convertido em etanol, que juntamente com o dióxido de carbono, são subprodutos da fermentação alcoólica. Durante esta etapa, ocorre a oxidação do NADH a NAD^+ , que transfere os seus eletrões ao acetaldeído, recorrendo à enzima álcool desidrogenase não havendo formação de qualquer molécula de ATP.

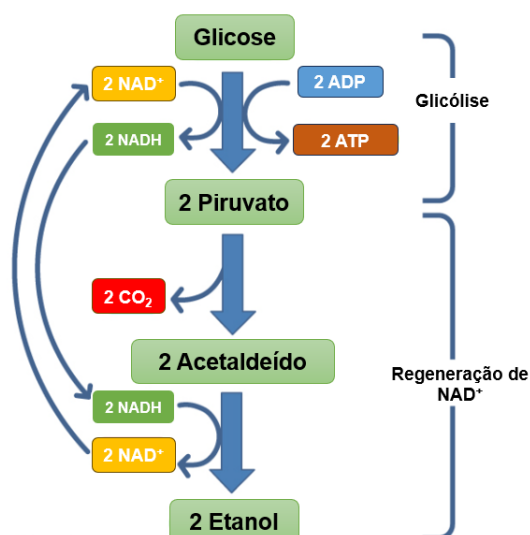


Figura 15 – Etapas da fermentação alcoólica, processo em que se converte a glucose em etanol (adaptado de Cardoso, 2019).

Na fermentação alcoólica, a fase inicial é dominada por uma vasta gama de leveduras indígenas (nomeadamente *Kloeckera*, *Hanseniospora* e *Candida*) e com baixa capacidade fermentativa e cujo crescimento é limitado pela concentração de etanol e dióxido de enxofre no mosto. Com o decorrer da fermentação e o aumento do teor em etanol, o crescimento destas estirpes diminui, tornando-se *Saccharomyces cerevisiae* a espécie dominante (Cardoso, 2019; Romano, 2003).

A nível industrial, é também *Saccharomyces cerevisiae* a levedura de eleição a ser inoculada para desencadear a fermentação, devido às suas características particulares como a resistência a elevadas concentrações de açúcares e capacidade de fermentar a quase totalidade dos açúcares que compõem o mosto, a resistência a elevadas concentrações de SO_2 , a resistência a baixos valores de pH e a resistência a elevados teores de etanol, tendo capacidade de produzir etanol até 17%vol.

A fermentação alcoólica, que decorre normalmente entre 3 a 30 dias (Ribéreau-Gayon et al., 2005) depende da temperatura do mosto, do teor de açúcares fermentescíveis disponíveis e do teor de oxigénio e azoto disponível para as leveduras (Cardoso, 2019). Como tal, esta é controlada sistematicamente, através da medição da massa volúmica do mosto e da temperatura a que está a decorrer o processo fermentativo.

Após a fermentação alcoólica terminar e, no caso de vinhos tintos, é desejável a ocorrência da fermentação malolática (Arnink & Henick-Kling, 2005).

Neste processo fermentativo, levado a cabo pelas bactérias lácticas (nomeadamente pela estirpe dominante *Oenococcus oeni*), ocorre a conversão do ácido málico (um ácido mais forte) presente no vinho em ácido láctico, através de uma descarboxilação promovida pela enzima malolática, com libertação de dióxido de

carbono (Figura 16) (Costantini et al., 2009). O objetivo principal deste tipo de fermentação é contribuir para a desacidificação biológica do vinho, com a redução da sua acidez titulável e aumento do pH bem como promover alterações sensoriais no mesmo, nomeadamente com a produção de diacetilo, responsável pelo caráter amanteigado dos vinhos e do desenvolvimento de aromas frutados em detrimento dos herbáceos (Alpuim, 1997; Bartowsky, 2017; Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Temperaturas inferiores a 18 °C provocam um atraso na fermentação malolática e pH abaixo de 3,2 e valores elevados de SO₂ exercem ação inibidora no processo (Cardoso, 2019).

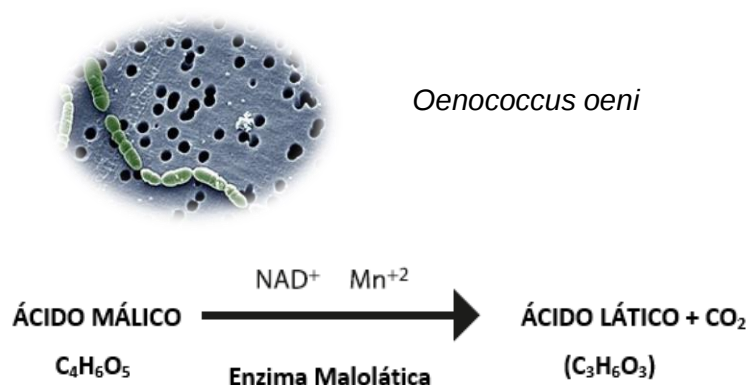


Figura 16 – Fermentação malolática, realizada por bactérias do ácido láctico (adaptado de Costello, 2005).

Contudo, é necessário proceder ao controlo da fermentação malolática, visto que ocorrendo de forma espontânea, pode levar ao aumento da acidez volátil, através da produção de uma pequena quantidade de ácido acético a partir da decomposição do ácido cítrico, ao consumo de açúcares residuais e à formação de alguns metabolitos indesejáveis.

A *Oenococcus oeni* (Figura 16) é a bactéria do ácido láctico normalmente selecionada pelos enólogos para promover esta fermentação a nível industrial, devido à sua elevada tolerância a ambientes com baixo pH (<3,5), elevadas concentrações de etanol e a temperaturas mais baixas (nomeadamente inferiores a 12°C).

4.2. O papel das leveduras na produção de vinhos

Os principais microrganismos envolvidos na produção de vinho são as leveduras, de que se destaca a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, bactérias do ácido láctico (BAL), bactérias do ácido acético (BAA) e alguns bolores (Van Wyk & Silva, 2019).

Na indústria enológica, é muito difícil traçar uma linha de distinção entre a atividade benéfica da fermentação por parte destes microrganismos e a atuação das

leveduras de contaminação, responsáveis por alterações organoléticas e químicas nos vinhos.

De facto, de todos os microrganismos passíveis de alterar as características organoléticas e sensoriais nos vinhos engarrafados, as leveduras são as mais importantes, devido à sua enorme capacidade em se adaptarem a ambientes extremos, sobrevivendo facilmente em alimentos com elevada acidez e com grandes concentrações de etanol, como é o caso dos vinhos (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

As leveduras de contaminação (Figura 17) podem subdividir-se em leveduras adventícias ou inocentes, que surgem esporadicamente no vinho, não tendo a capacidade de crescimento e as leveduras de alteração (as mais preocupantes) que crescem facilmente no produto em questão, provocando alterações na sua constituição e nas suas características organoléticas (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

As leveduras de deterioração (Tabela 2) podem dividir-se entre leveduras *sensu lacto*, ou seja, as espécies capazes de alterar as características organoléticas do vinho, independentemente da sua resistência aos processos tecnológicos de estabilização e aos vários tipos de conservantes usados na indústria e as leveduras *sensu stricto* (as mais perigosas das leveduras de alteração) e que dispõem de mecanismos de grande resistência a condições ambientais de stress, podendo mesmo afetar vinhos que foram processados e engarrafados de acordo com as boas práticas de fabrico (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

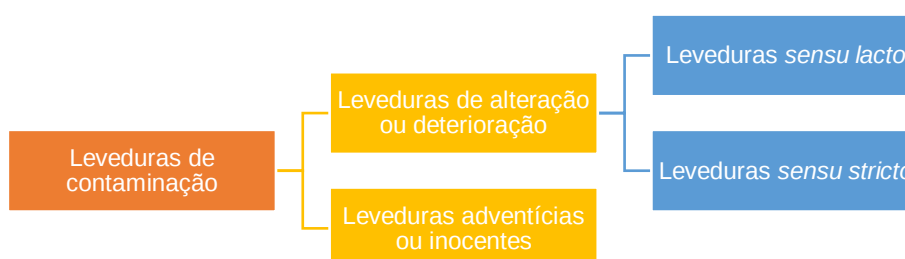


Figura 17 – Distinção entre os vários tipos de leveduras de contaminação no vinho (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003)

É imperativo monitorizar os vários microrganismos de alteração ao longo de todas as etapas do processo de vinificação, tendo em conta que a deterioração do vinho pode ocorrer antes ou depois da fermentação, nomeadamente nas etapas de vinificação, estágio, engarrafamento e envelhecimento de vinhos (Tabela 2) (Arnink & Henick-Kling, 2005; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

Tabela 2 - Leveduras de alteração mais presentes no vinho (adaptado de Malfeito-Ferreira & Loureiro, 1995)

ESPÉCIES	PROBLEMA/COMPOSTO	OCORRÊNCIA
Espécies oxidativas		
<i>Pichia anomala</i>	Véu; aroma (acetato de etilo)	Vinificação e armazenamento
<i>Pichia membranifaciens</i>	Véu; aroma (ésteres)	Vinificação e armazenamento
<i>Candida</i> sp.	Véu; aroma (ésteres)	Armazenamento
Espécies fermentativas		
<i>Kloeckera apiculata</i>	Aroma (ésteres)	Vinificação
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Aroma (ésteres)	Vinificação
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	Escurecimento; Aroma (acetaldeído)	Vinificação, armazenamento e engarrafamento
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.	Sedimentos; escurecimento; refermentação	Armazenamento e engarrafamento
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Sedimentos; escurecimento; refermentação	Armazenamento e engarrafamento
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Aroma; perda de acidez fixa; aumento da acidez volátil	Vinificação e estágio

A *Brettanomyces bruxellensis* (Figura 18) (ou na sua forma esporulada, *Dekkera bruxellensis*) é uma levedura unicelular oxidativa, pertencente ao filo Ascomycota, sendo considerada a levedura de deterioração mais preocupante em vinhos tintos, nomeadamente naqueles envelhecidos em barricas de madeira ou originários de uva de fraca qualidade, podendo estar presente na vinha, na superfície das uvas e mosto, bem como por toda a adega e mais frequentemente na água e solo (Schifferdecker et al., 2014; Wedral et al., 2010). Devido ao seu potencial deteriorativo, pode provocar perdas económicas na ordem das centenas de milhares de euros (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003; Malfeito-Ferreira, 2011; Wedral et al., 2010).

Com crescimento lento e capaz de persistir no vinho por longos períodos de tempo, a *Brettanomyces bruxellensis* (da família *Cyptococcaceae*) é responsável pela produção de fenóis voláteis, nomeadamente 4-etil fenol (4-EP), 4-etilguaicol (4-EG) e 4-etil catecol (4-EC) (Figura 19). Estes compostos, quando em quantidades elevadas (superiores a 620 µg/L no caso de 4-EP ou a 426 µg/L para uma mistura 10:1 de 4-EP:4-EG), contribuem para a deteção de aromas fenólicos nos vinhos, designados de *caráter Brett*, associado ao odor característico de “suor de cavalo”, sangue e estrebaria (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003; Malfeito-Ferreira, 2019; Rodrigues et al., 2001; Wedral et al., 2010).

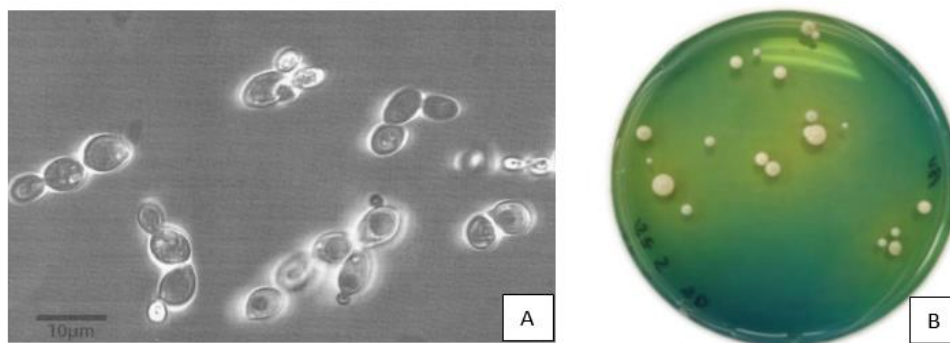


Figura 18 – A: Observação de células de *Brettanomyces* através de microscopia com contraste de fase (1.000X) (Fugelsang & Edwards, 2010); B: Aspeto típico de colónias de *Brettanomyces* spp., inoculadas em meio de cultura seletivo para deteção de *Brettanomyces* spp. (Tubia et al., 2018).

Na presença desta levedura, formam-se também outros metabolitos como o ácido acético (resultante da oxidação do etanol), levando ao consequente aumento do teor de acidez volátil e tetrahidropiridinas (associado ao descritor “cheiro a urina de rato”), provocando alterações organoléticas indesejáveis e irreversíveis nos vinhos armazenados, em estágio ou já engarrafados (Fleet, 2003; Rodrigues et al., 2001).

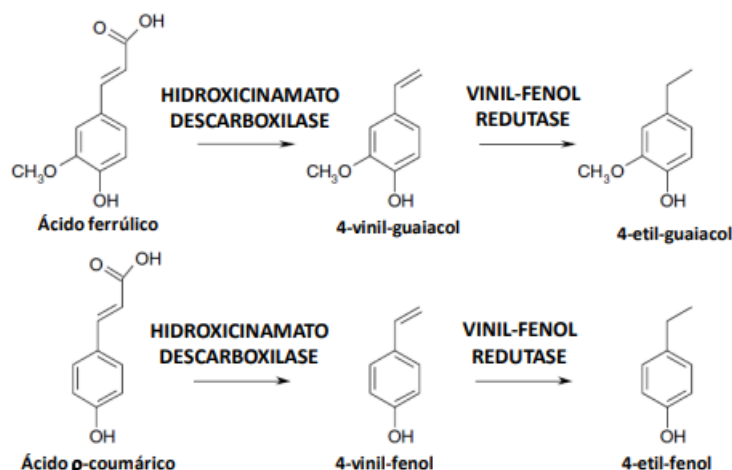


Figura 19 - Formação de 4-etil-guaiacol e 4-etil-fenol a partir dos seus precursores hidroxicinâmicos, presentes no mosto (adaptado de Suárez et al., 2007)

É recomendado o controlo de *Brettanomyces* spp. nos vinhos durante a fase de envelhecimento e no momento em que ocorre o engarrafamento. Durante a fase de envelhecimento ou estágio, a análise microbiológica não requer a completa eliminação da levedura, procurando apenas assegurar que o nível de contaminação é reduzido, de forma a evitar que a concentração de fenóis voláteis atinja valores detetados organoleticamente. Já no engarrafamento, o principal objetivo prende-se com a eliminação total da levedura, sendo que apenas uma célula viável por garrafa pode contribuir para a posterior deterioração do vinho engarrafado (Malfeito-Ferreira, 2018, 2019).

4.3. Doenças no vinho causadas por microrganismos

O vinho é um produto suscetível de sofrer alteração por parte de microrganismos, podendo modificar-se pelo efeito de fenómenos físico-químicos, de que pode resultar a formação de películas, turvação, formação de depósitos e produção de gás em vinhos engarrafados, assim como o desenvolvimento de aromas não característicos ao longo dos processos de vinificação e armazenamento (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003; Ribéreau-Gayon, 1989).

De entre as principais alterações causadas por leveduras distinguem-se a flor do vinho, a refermentação ou o desenvolvimento de leveduras de contaminação (Cardoso, 2019).

A flor do vinho ocorre normalmente quando se deixa o vinho em contacto com o ar e em casos de incorreta sulfitação, sendo caracterizada pela presença de uma película na superfície do vinho – “véu” esbranquiçado – que vai ganhando espessura e acaba por também se prender nas paredes da garrafa e/ou depósito. Esta película é constituída por leveduras da espécie *Candida vini*, que metabolizam o etanol, produzindo acetaldeído, substância responsável pela alteração organolética verificada. A doença é facilmente evitada com o atesto regular e correta sulfitação dos depósitos (Cardoso, 2019; Cardoso et al., 2005)

Como já referido, a levedura *S. cerevisiae* participa ativamente na fermentação alcoólica. Contudo, pode também causar refermentação em vinhos engarrafados, principalmente quando estes apresentam uma quantidade de açúcares residuais superior a 2 g/L (Gomes, 2009). Esta alteração, que se manifesta com a produção de dióxido de carbono e a ocorrência de turvação, deriva da permanência de algumas leveduras fermentativas ativas, do género *Saccharomyces* spp. (*S. cerevisiae* e *S. ludwigii*) ou a espécie *Zygosaccharomyces bailii*, mesmo após o engarrafamento (Kunkee & Bisson, 1993).

A formação de biofilmes na superfície do vinho acontece, normalmente, durante o seu armazenamento em barricas, depósitos e garrafas com excessiva camada de ar, sendo as leveduras dos géneros *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metchikowia* e *Debaryomyces*, as responsáveis por este tipo de alteração (Kunkee & Bisson, 1993).

As bactérias podem também estar envolvidas em algumas das doenças mais manifestadas em vinhos. Das patologias de origem bacteriana destacam-se o pico acético (ou azedia), a volta, a doença do amargor, a doença do pico láctico e a doença da gordura (Cardoso et al., 2005).

A doença do pico acético, ou habitualmente designada por azedia, é causada por bactérias acéticas (sobretudo *Acetobacter* spp.), suscetíveis ao etanol, pelo que a

doença ocorre normalmente em vinhos com um teor alcoólico mais baixo (Cardoso, 2019). É caracterizada pelo desenvolvimento de um aroma azedo (gosto característico de vinagre, devido à presença do composto acetato de etilo), fruto da ocorrência da fermentação acética (transformação do etanol por oxidação em ácido acético) e levando ao aumento da acidez volátil. A esta doença está também associada uma diminuição da cor do vinho e a formação de uma película superficial branca-acinzentada (Cardoso, 2019).

A doença da volta, provocada essencialmente por bactérias lácticas do género *Lactobacillus*, manifesta-se pela diminuição da acidez titulável e aumento do pH e acidez volátil, devido à degradação do ácido tartárico, produzindo-se dióxido de carbono, ácido acético e ácido succínico (Cardoso, 2019). As manifestações físicas no vinho passam pelo aparecimento de nuvens ténues, com o aspeto de algodão, que se movem lentamente no vinho. Pode também levar à produção de gás, que pode mesmo projetar as rolhas, ao surgimento de um aroma desagradável e à alteração da cor dos vinhos, que se tornam acinzentados, no caso dos tintos, e verde-acastanhados, no caso dos brancos (Navarre, 1997).

A doença do pico láctico, causada por bactérias lácticas, nomeadamente do género *Lactobacillus*, manifesta-se em condições de temperatura e de pH elevados, quando existem nos vinhos açúcares residuais (hexoses e pentoses) que servem de substrato às bactérias, levando à produção de ácido acético, ácido láctico, CO₂ e etanol. É frequentemente associada a uma turvação do vinho (Cardoso, 2019).

A doença do amargor, causada por bactérias lácticas *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus cellobiosus* e *Leuconostoc mesenteroides*, está associada a vinhos engarrafados tintos velhos, pouco ácidos, com baixo teor alcoólico e algum teor em taninos. É caracterizada sensorialmente por um sabor amargo pronunciado, alguma libertação de gás e perda de cor do vinho. Em termos químicos, ocorre a degradação do glicerol, levando à formação de ácido acético, ácido láctico, dióxido de carbono, água e alguns metabolitos secundários, como a acroleína, responsável pelo sabor amargo característico (Gomes, 2009).

A doença da gordura, causada pelas bactérias *Oenococcus oeni* ou *Pediococcus cerevisiae*, traduz uma condição particular em que, paralelamente à degradação do ácido málico, há um aumento da viscosidade do vinho, causado pela agregação de moléculas de glucose num polissacarídeo, criando-se uma espécie de rede, onde se encontram as bactérias lácticas responsáveis pela doença. Ocorre sobretudo em vinhos brancos com baixo teor alcoólico e pH elevado, embora também ocorra em vinhos tintos. Não há alterações conhecidas a nível organolético e químico, mantendo-se inalterados a cor, aroma e os níveis de acidez volátil do vinho (Gomes, 2009).

5. Estabilização microbiológica dos vinhos

A estabilidade microbiológica nos vinhos é uma preocupação constante e sempre presente na rotina diária da indústria da produção vinícola.

Em adega, é importante considerar o risco de contaminação durante a etapa de estágio de vinhos em depósitos ou barricas de madeira. Quando o estágio decorre em barricas, onde, por circunstância da complexidade do equipamento (natureza porosa da madeira), a higienização torna-se mais difícil de ser bem-sucedida, há frequentemente o aumento da microbiota do vinho, com o aparecimento de espécies de leveduras como *Saccharomyces* e *Brettanomyces* e de bactérias como *Acetobacter*, *Oenococcus* e *Pediococcus*, e que, caso não sejam eliminadas, podem levar à deterioração do vinho (Malfeito-Ferreira, 2011).

O engarrafamento é outro ponto crítico na indústria vitivinícola, sendo que, quando inadequado, pode introduzir oxigénio no vinho. Face às condições aeróbias disponibilizadas, este passa a ser um meio propício para o crescimento exponencial de leveduras no vinho engarrafado (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003; Malfeito-Ferreira, 2011).

Sendo assim e tendo como objetivo principal a garantia da qualidade organolética do vinho que chega aos consumidores, são aplicados, durante o processo de produção, tratamentos térmicos, químicos e/ou físicos com vista à estabilidade microbiológica dos vinhos produzidos (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

5.1. Processo de higienização

A aplicação de boas práticas de higiene ao longo do processo de produção é um requisito indispensável para a obtenção de vinhos de excelente qualidade (Bártolo & Rosa, 2014). Para além de ser uma obrigatoriedade legal (Regulamento (CE) nº852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios), ajuda a evitar o crescimento microbiano no vinho com a redução de possíveis contaminações cruzadas, bem como a ocorrência de possíveis alterações organoléticas, garantindo a satisfação do cliente, bem como a qualidade final do produto (Rosa, 2008).

O processo de higienização, que visa a proteção da saúde pela eliminação de resíduos, sujidades e possíveis microrganismos contaminantes, compreende habitualmente uma série de etapas, nomeadamente limpeza e consequente desinfecção, imprescindíveis para o sucesso do processo (Figura 20). A eficácia e sucesso da higienização está dependente de vários fatores tais como a temperatura, a

concentração e tempo de contacto dos agentes químicos utilizados e a presença ou ausência de ação mecânica (Cardoso, 2019).

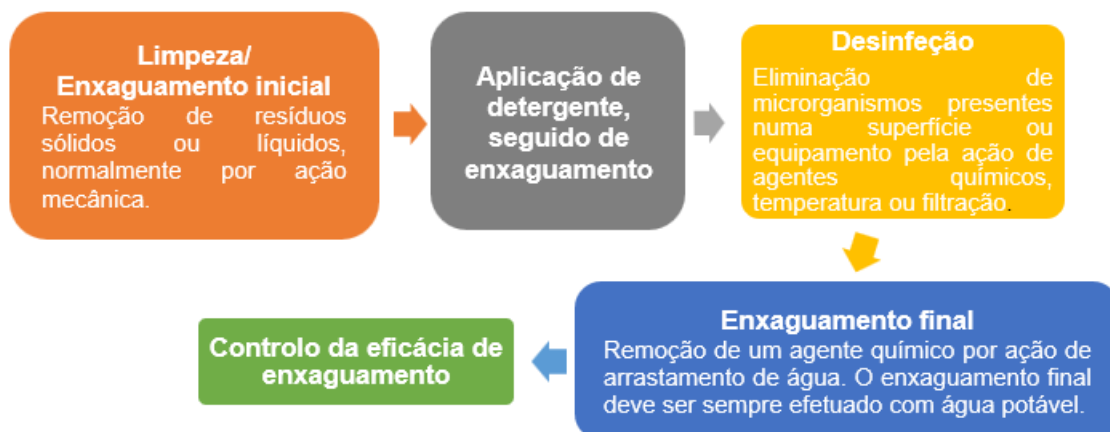


Figura 20 – Conjunto de etapas a cumprir de modo a se conseguir uma boa higienização (Bártolo & Rosa, 2014).

Para além dos resíduos habituais (orgânicos e inorgânicos) e corretamente eliminados numa eficiente higienização (Figura 21), os biofilmes, comunidades de microrganismos fortemente ligadas às superfícies e de muito difícil remoção, continuam a ser um dos maiores problemas a ter em conta na indústria dos vinhos, sendo bastante resistentes aos agentes desinfetantes comparando com os microrganismos em suspensão (Bártolo & Rosa, 2014).

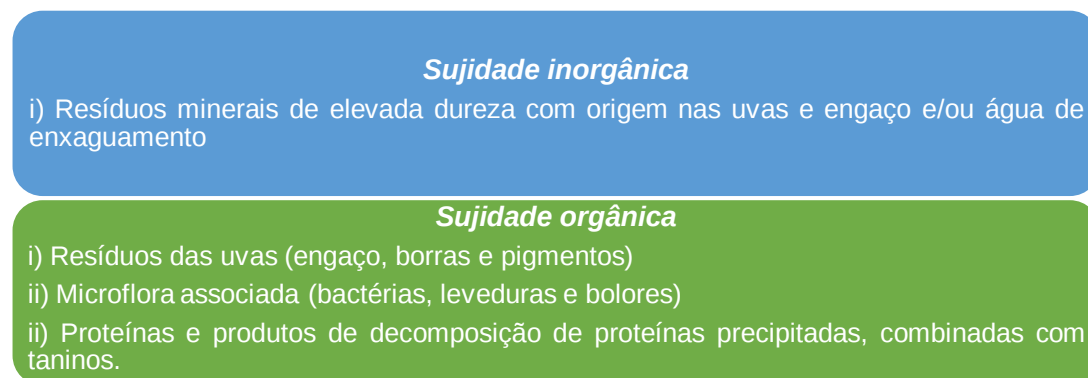


Figura 21 – Tipos de sujidade a eliminar no processo de higienização (Bártolo & Rosa, 2014).

Um parâmetro a ter em conta na higienização da adega é a qualidade da água de enxaguamento, visto que esta tem de estar isenta de microrganismos patogénicos e de deterioração do vinho e não apresentar sabores ou cheiros estranhos. Como tal, devem ser realizadas frequentemente análises físico-químicas e microbiológicas à água utilizada no processo, nomeadamente à concentração de cálcio e/ou magnésio, visto que uma água com dureza elevada pode interferir com a eficiência dos detergentes utilizados na higienização ou a presença de bactérias coliformes, valor esse que não deverá ultrapassar as 50 UFC/100ml de amostra. Na Global Wines S.A.

este controlo é realizado trimestralmente, sob a responsabilidade da equipa de Qualidade.

Na higienização em adega, é comum o uso de vários tipos de detergentes e desinfetantes, tendo em conta o tipo de sujidade a eliminar e material a higienizar, o impacto ambiental na sua utilização, a natureza da água de enxaguamento e o modo de aplicação (Bártolo & Rosa, 2014).

No plano de higienização da empresa Global Wines S.A. é sugerida a utilização de três agentes químicos distintos – um detergente cáustico (Proenol, 2019c), um detergente desinfetante alcalino clorado (Proenol, 2019b) e um desinfetante à base de ácido peracético a 5% (Proenol, 2019a) - dependendo do equipamento ou local a higienizar (Anexo I).

É necessário após o processo de higienização de equipamentos e superfícies, garantir que os mesmos se encontram isentos dos agentes químicos utilizados na sua higienização. Para tal, realiza-se um controlo da eficácia de todo o processo, primeiramente com a verificação de ausência de um determinado agente químico previamente utilizado no processo de higienização (Bártolo & Rosa, 2014), através de indicadores específicos e por fim, uma verificação da eficácia da etapa de limpeza, recorrendo a tiras de pH ou solução de etanol a 70% vol. (Global Wines S.A., 2022).

De realçar a utilização paralela de uma espuma alcalina, de elevado conteúdo em cloro (Hypofoam), nas limpezas diárias e/ou semanais realizadas em adega e na zona de pré-engarrafamento, nomeadamente na limpeza realizada aos exteriores dos depósitos (Global Wines S.A., 2022).

5.2. Aplicação de conservantes

O dióxido de enxofre (SO_2) é um aditivo usado em várias indústrias alimentares e está especialmente indicado para ser utilizado em alimentos de baixo pH, como sumos de frutos e bebidas. Sendo assim, desempenha um papel imprescindível na indústria enológica, ao ser um dos principais conservantes aplicados na produção de vinhos e espumantes, apesar dos seus inconvenientes de origem organolética e toxicológica.

Vulgarmente designado como anidrido sulfuroso, o SO_2 apresenta propriedades únicas que o tornam um conservante do vinho e/ou mosto por excelência (Cardoso, 2019; Jackowetz & Orduña, 2012) (Figura 22).

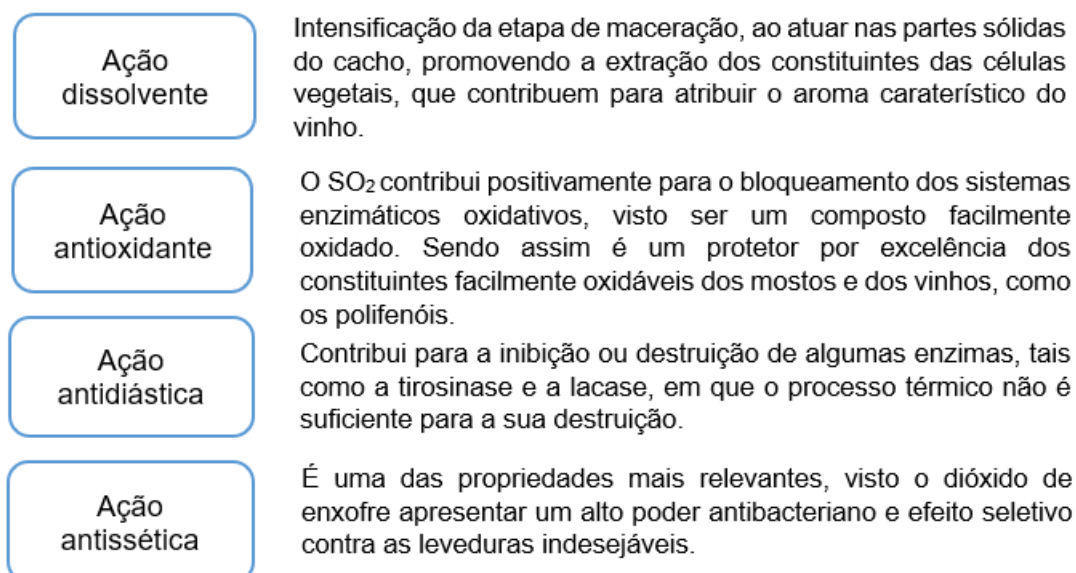


Figura 22 – Propriedades da aplicação do dióxido de enxofre na produção de vinhos (adaptado de Cardoso, 2019).

Após a adição de SO₂ a um mosto ou vinho, este pode-se encontrar presente livremente (SO₂ livre), sob a forma de SO₂ molecular (responsável pela componente antisséptica deste composto) ou como ião bissulfito (HSO₃⁻, resultante da reação do SO₂ molecular com a água). Contudo, uma parte considerável de anidrido sulfuroso adicionado acaba por se combinar com outros compostos (SO₂ combinado). Sendo assim, a totalidade de SO₂ existente num mosto ou vinho (SO₂ total) acaba por ser o somatório destas duas frações (Cardoso, 2019).

O SO₂ é normalmente utilizado na indústria alimentar sob a forma de anidrido sulfuroso puro (com recurso a botijas de gás e a um sulfímetro), através da adição de metabissulfito de potássio ou bissulfito de potássio ou recorrendo a uma solução sulfurosa em água.

Há registos na literatura da utilização com sucesso de radiação ultravioleta como alternativa direta à aplicação de SO₂ como estabilizante microbiológico em mostos e vinhos, contudo esta técnica ainda é pouco utilizada na indústria (Alves et al., 2017).

Outro dos conservantes mais utilizados na indústria enológica e com propriedades antimicrobianas reconhecidas é o DMDC – dicarbonato de dimetilo (Figura 23). Tem a vantagem de não levar a alterações organoléticas no vinho, ao contrário do SO₂. É utilizado normalmente com o objetivo de obter a estabilidade microbiológica de vinhos engarrafados, contendo açúcares fermentescíveis durante um longo período de tempo, evitar o desenvolvimento de leveduras indesejáveis e bactérias lácticas e bloquear a fermentação de vinhos doces (Cardoso, 2019).

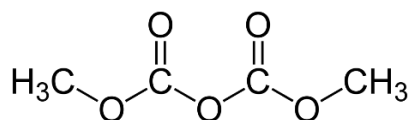


Figura 23 – Estrutura química do DMDC (dicarbonato de dimetilo) (Cardoso, 2019).

A sua utilização, uma alternativa à redução cada vez maior da utilização de anidrido sulfuroso como principal tratamento químico de estabilidade microbiológica em vinhos, é permitida, na União Europeia, até uma dose máxima cumulativa de 200 mg/L, considerada letal para diversos microrganismos, nomeadamente leveduras dos géneros *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Brettanomyces* (Costa et al., 2008) e impedindo a reprodução das bactérias acéticas (*Acetobacter*) e bactérias lácticas (*Lactobacillus*), mantendo-as num estado vegetativo (Cardoso, 2019). A sua eficiência nestes microrganismos vai depender da estirpe, da concentração inicial de colónias, temperatura, percentagem em etanol e pH do vinho (Threlfall & Morris, 2002).

Segundo o Regulamento (CE) Nº 643/2006, a sua adição deverá ocorrer pouco antes do engarrafamento e o tratamento só poderá ser aplicado a vinhos com teor de açúcares superior a 5 g/L.

Com alguma frequência, são também aplicados pela indústria do vinho outros conservantes tais como o ácido sórbico (sob a forma de sorbato de potássio), com propriedades antimicrobianas e fungistáticas (Cardoso, 2019).

Mais recentemente, novas investigações no nosso país têm sido feitas no sentido de descobrir alternativas aos conservantes químicos mais sustentáveis e naturais acima referidos, destacando-se os trabalhos efetuados com recurso à flor de castanheiro (*Castanea sativa*) e um filme à base de quitosana, com origem no exosqueleto de crustáceos (Ferreira et al., 2020; Silva et al., 2013).

5.3. Pasteurização

Apesar de fermentações controladas, de uma higienização bem-sucedida ou de aplicação de conservantes, os tratamentos através da temperatura, nomeadamente a pasteurização, continua a ser um dos métodos mais eficazes em eliminar os microrganismos indesejados e, como tal, contribuir para a estabilização microbiológica e conservação organolética do vinho (Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Existem quatro aplicações técnicas diferentes relacionados com o tratamento térmico do vinho: a pasteurização, a pasteurização *flash*, a pasteurização em garrafa (túnel) e o engarrafamento a quente (termolização) (Ezequiel, 2010).

A pasteurização (Figura 24 – A) compreende a passagem do vinho por um permutador de serpentina, com água em contracorrente a 60-65°C durante cerca de 1

minuto (estabulação). De seguida, o vinho é arrefecido à temperatura ambiente na saída do permutador, com uma contracorrente de vinho frio, possibilitando uma poupança energética do processo (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Na pasteurização *flash* (Figura 24 – B), o vinho é submetido a um aquecimento de curta duração a altas temperaturas (95°C durante cerca de 2-6 segundos), após o qual é refrigerado rapidamente com recurso a um permutador, até atingir novamente a temperatura ambiente. Este método tem a vantagem de, sendo mais rápido, poder permitir uma menor afetação das características organoléticas do vinho (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Na pasteurização em garrafa (túnel) (Figura 24 – C), o tratamento do vinho é realizado quando este já se encontra engarrafado. As garrafas entram numa espécie de túnel, onde são aquecidas até cerca de 55-60°C por imersão em água quente, arrefecendo posteriormente à temperatura ambiente (Flanzy, 1998). Tem a desvantagem de poder levar ao dilatamento do vinho e consequente rebentamento da rolha, mesmo sendo um dos tratamentos térmicos a oferecer uma maior segurança em termos microbiológicos.

O engarrafamento a quente, designado por termolização (Figura 24 – D) é a técnica de tratamento térmico mais usada no engarrafamento de vinhos tintos na empresa Global Wines S.A. O princípio desta técnica consiste no aquecimento repentino do vinho a uma temperatura relativamente moderada a quente (50-55°C ou 90°C), permitindo a eliminação do maior número de microrganismos indesejáveis, num processo muito idêntico à pasteurização *flash*. Contudo, neste tratamento térmico, o vinho é engarrafado ainda quente, arrefecendo depois à temperatura ambiente dentro da garrafa, permitindo assim esterilizar tanto o vidro da garrafa como a rolha (Flanzy, 1998). Tem a grande vantagem de não provocar grandes alterações nos vinhos engarrafados.

Embora sejam métodos bastantes eficazes na estabilização dos vinhos, ainda há quem tenha algumas reservas na sua utilização, com o argumento de que possa causar alterações organoléticas no produto final.

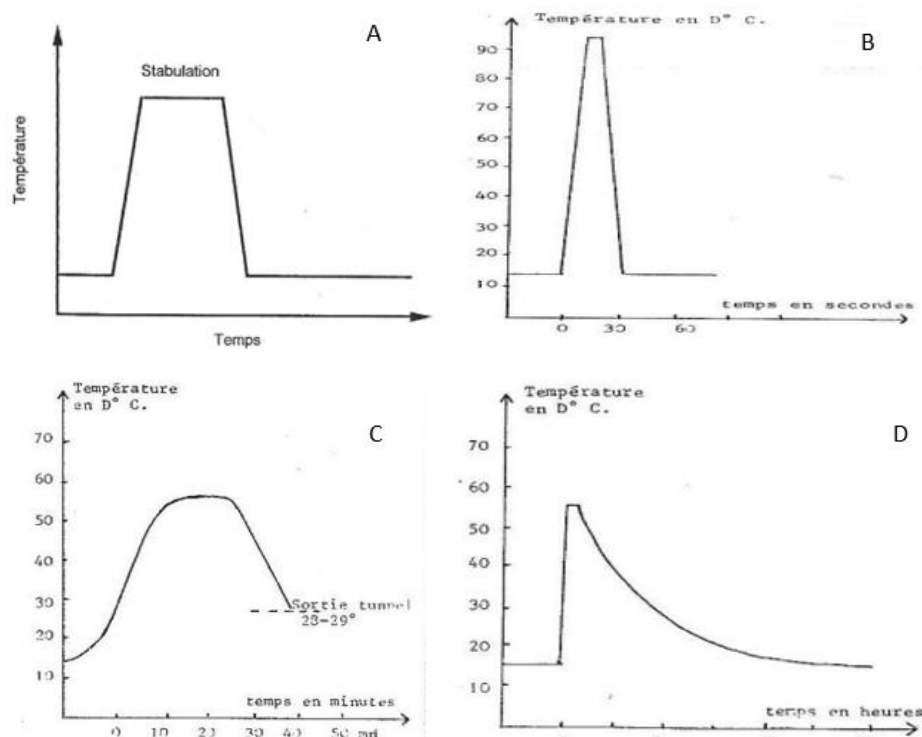


Figura 24 – Gráficos tempo-temperatura dos vários tratamentos térmicos aplicados nos vinhos: A – pasteurização; B – pasteurização flash; C – pasteurização em garrafa (túnel); D – engarrafamento a quente (termolização) (Flanzy, 1998)

5.4. Filtração

Entende-se por filtração a eliminação de uma fase sólida em suspensão numa fase líquida, por passagem através de uma superfície porosa, que constitui o suporte filtrante, destinado a reter as partículas sólidas. Este processo garante mais uma vez a estabilidade microbiológica do vinho engarrafado, impedindo o crescimento microbiano através da eliminação das bactérias e leveduras indesejáveis (filtração esterilizante) (Rayess et al., 2011; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003), para além de contribuir para a diminuição da turbidez (filtração clarificante), garantindo um vinho mais límpido e livre de partículas em suspensão (Cardoso et al., 2005).

Existem diversos tipos de filtração, ao serviço da enologia, nomeadamente filtração por terras, filtração por placas ou módulos, filtração tangencial e filtração por membrana, bem como três tipos de camadas filtrantes: terras de diatomáceas, perlite e celulose. A escolha da filtração adequada a determinada etapa do processo de produção de vinhos vai depender das partículas que se quer remover ou eliminar, podendo tratar-se de macropartículas como areias, detritos minerais e orgânicos até as partículas mais pequenas como microrganismos (Cardoso, 2019; Lidon & Silvestre, 2008).

Numa fase inicial do processo, o vinho pode sofrer uma filtração clarificante com recurso a terras de diatomáceas, com o objetivo de remover as partículas de maiores dimensões existentes neste, permitindo assim a diminuição da sua turbidez. Na Global Wines S.A. este tipo de filtração ocorre na zona da adega, com recurso a um filtro de terras (Figura 25).

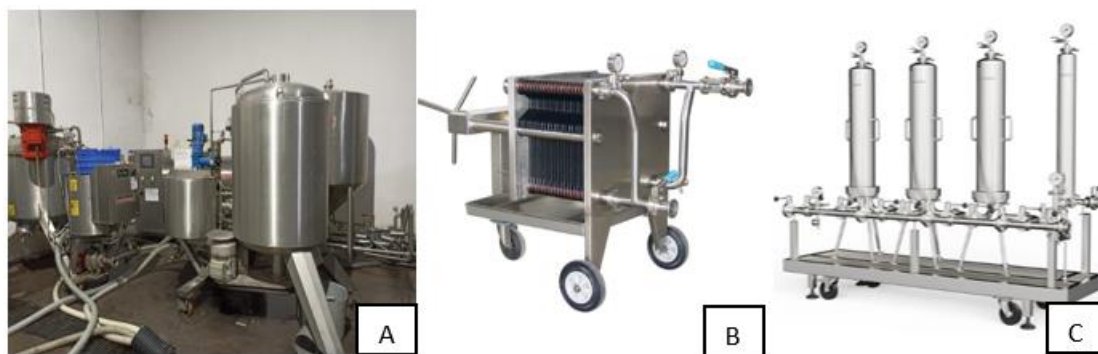


Figura 25 - Equipamento de filtração do vinho utilizado na empresa Global Wines S.A.: A – Filtro de terras; B – Filtro de placas; C – filtro de membranas.

Posteriormente o vinho é submetido a uma filtração por placas de celulose clarificantes, de porosidade $0,60 - 0,80 \mu\text{m}$ ou por placas de celulose esterilizantes de porosidade $0,40 - 0,50 \mu\text{m}$ (Figura 25 – B). O objetivo, para além de diminuir ainda mais a turbidez do vinho (abaixo dos 5 NTU), é garantir o início da estabilização microbiológica do mesmo, impedindo a colmatagem posterior do filtro de membranas, o que poderia acarretar altos custos monetários e atrasos nos planeamentos de produção. Esta filtração pode ocorrer tanto na zona de adega - filtração mais clarificante - ou na zona de pré-engarrafamento, com objetivos mais esterilizantes.

A filtração por membrana (esterilizante) é um processo efetuado imediatamente antes da etapa de engarrafamento, de forma a evitar a deterioração de vinhos pelo desenvolvimento de microrganismos ainda presentes em suspensão no mesmo (Butzke, 2010). A porosidade da membrana ($0,65 \mu\text{m}$ ou $0,45 \mu\text{m}$) deve ser escolhida considerando a menor dimensão do microrganismo que se pretende reter. Na empresa Global Wines S.A. é utilizado um filtro de membranas (Figura 25 - C) com cartuchos de celulose de porosidade $0,45 \mu\text{m}$, antes do engarrafamento de vinhos brancos e rosés, bem como na passagem do vinho base antes de ocorrer a etapa de tiragem no processo de produção de vinhos espumantes. Deve sempre proceder-se à determinação do índice de colmatagem (IC) do filtro de membranas, sendo desejável que o vinho entre na linha de engarrafamento com o IC mais baixo possível, promovendo assim uma maior longevidade dos cartuchos de celulose da membrana (Cardoso, 2019).

5.5. Clarificação e centrifugação

A clarificação é um processo que tem como objetivo principal o aumento da limpidez do vinho, através da eliminação de impurezas que se encontrem em suspensão, através da sua coagulação e formação de partículas mais densas que acabam por sedimentar.

Em enologia, um dos processos clarificantes mais utilizados é a colagem (Figura 26). Esta técnica consiste na adição de substâncias proteicas (colas) ao vinho que irão flocular e precipitar, arrastando consigo as partículas em suspensão que causam a turbidez do mesmo (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Os produtos enológicos mais utilizados atualmente neste processo são a gelatina, a caseína, a albumina do ovo, a albumina do sangue, a cola de peixe, as bentonites, a sílica (dióxido de silício), os taninos enológicos, colas de origem vegetal e a goma arábica (Cardoso, 2019).

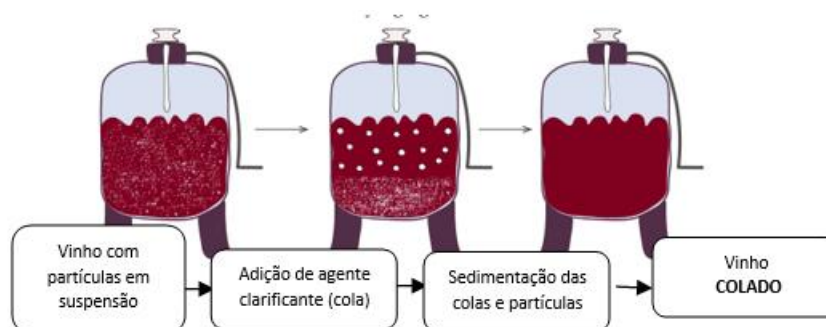


Figura 26 – Processo de colagem, uma técnica de clarificação aplicada na produção de vinhos (adaptado de Jiménez-Martínez et al., 2018)

Esta técnica, muito utilizada na produção de vinhos brancos, para além de permitir obter a estabilidade da limpidez (estabilidade da matéria corante e prevenção da casse férrica), contribui positivamente para uma posterior etapa de filtração clarificante e esterilizante, aumentando assim o sucesso na promoção da estabilidade microbiológica do vinho.

A centrifugação é também muito utilizada na remoção das partículas em suspensão no vinho. O principal objetivo desta técnica é acelerar a sedimentação das partículas, fazendo uso da força centrífuga, gerada por rotação (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Contudo, embora seja uma excelente técnica para obter um bom nível de clarificação do vinho, a centrifugação apresenta uma eficácia bastante limitada na eliminação microbiológica, sendo apenas capaz de eliminar alguns microrganismos em suspensão (Lidon & Silvestre, 2008).

6. Controlo da qualidade no processo de produção de vinhos

6.1. Análises microbiológicas

No laboratório da empresa Global Wines S.A., são realizadas rotineiramente análises microbiológicas com vista ao controlo microbiológico dos vinhos engarrafados.

Este controlo microbiológico pode ser indicativo e qualitativo, ou seja, unicamente com o intuito de detetar a presença de microrganismos, ou ser quantitativo, pela contagem dos microrganismos presentes (Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Na Global Wines S.A. recorre-se ao método de filtração por membrana para pesquisa de microrganismos viáveis. O objetivo deste método é pesquisar a presença de microrganismos aeróbios (leveduras e bolores), que possam estar presentes no produto final, com recurso a meios de cultura gerais e seletivos.

O método de filtração por membrana (Figura 27) baseia-se na filtração de um volume de amostra conhecido (100mL), mediante pressão negativa (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 apropriado que, por capilaridade, vai difundir para a membrana entrando em contacto com os microrganismos. Após um período de incubação em condições de aerobiose, a temperatura controlada, desenvolvem-se colónias que podem ser contadas como UFC/ mL (Eaton & American Public Health Association, 2006; Fugelsang & Edwards, 2010). Este método é usado em amostras com número reduzido de microrganismos, limitado à análise de amostras límpidas, sem sólidos em suspensão, no controlo microbiológico de vinhos engarrafados, sendo um método comum e de baixo custo.

Este procedimento (Anexo IV) e manipulação do material e equipamentos são realizados em ambiente o mais asséptico possível, em câmara de fluxo laminar, devidamente desinfetada com recurso a luz ultravioleta.



Figura 27 – Método de filtração por membrana, usado na deteção e quantificação de microrganismos presentes em vinhos engarrafados (adaptado de Fugelsang & Edwards, 2010).

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

i) para deteção de bolores e leveduras, usa-se o meio de cultura WLN Nutrient Agar (Anexo III). Com este meio de cultura, a temperatura e tempo de incubação é de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 18-48 horas. O meio apresenta cor azul a verde-azulado.

ii) para deteção de *Brettanomyces* spp., usa-se o meio de cultura *Brettanomyces* Agar (Anexo II). Com este meio de cultura seletivo, a temperatura e tempo de incubação é de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante 7 dias, devido ao crescimento lento característico desta levedura. O meio apresenta aparência azul-turquesa.

A pesquisa de *Brettanomyces* spp. e bolores e leveduras é efetuada em várias etapas do processo de produção, tendo em conta o definido no Plano de Controlo e Análise em vigor na empresa, ou sempre que se justificar:

i) Estágio/Loteamento (Figura 10 - **10**), na produção de vinhos tintos, efetua-se pesquisa de *Brettanomyces* spp.;

ii) Após engarrafamento de vinhos tintos, efetua-se pesquisa de bolores e leveduras e *Brettanomyces* spp.;

iii) Após engarrafamento de vinhos brancos e rosés, efetua-se pesquisa de bolores e leveduras;

iv) Na etapa de Tiragem (Figura 12 – **2,4,7,8,9**), efetua-se pesquisa de bolores e leveduras.

Os resultados são apresentados em unidades formadoras de colónias (UFC) por 100 mL (volume filtrado por cada amostra de vinho).

Não existem atualmente limites legais (OIV e/ou União Europeia) relativamente aos parâmetros microbiológicos em vinhos, visto estes serem raramente contaminados por microrganismos patogénicos. Contudo, e de forma a promover a qualidade máxima dos seus produtos, a Global Wines S.A. definiu, a nível interno, <100 UFC/100 mL de amostra de vinho, no caso de vinhos tranquilos com <4 g/L de teor de açúcares redutores e <50 UFC/100 mL de amostra de vinho, no caso de vinhos tranquilos com ≥ 4 g/L de teor de açúcares redutores.

6.2. Análises físico-químicas

Para além dos parâmetros analíticos microbiológicos, são determinados, diariamente e ao longo do processo de produção alguns parâmetros físicos e químicos que permitem verificar e controlar a qualidade dos vinhos engarrafados.

Alguns dos parâmetros mais usuais no dia-a-dia do laboratório da Global Wines S.A. são descritos de seguida, tendo em conta que a colaboração diária na realização deste tipo de análises também fez parte do decorrer do estágio.

A maioria dos parâmetros físico-químicos de um vinho (acidez volátil, acidez total, massa volúmica, extrato seco, pH, teor alcoólico, açúcares) podem ser realizados de uma forma célere e automática (análise sumária do vinho), recorrendo a métodos instrumentais como o analisador FTIR (Figura 28 - A). Este equipamento recorre à potencialidade da Espetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.

O funcionamento da espectroscopia por FTIR pode ser resumido nos seguintes passos: é gerado um sinal, interferograma, pelo interferómetro. Este interferograma é o sinal que o detetor de infravermelhos recebe em função da diferença entre os dois raios do interferómetro. Contudo, este sinal é um gráfico intensidade vs tempo, pelo que é necessário recorrer a uma operação matemática denominada Transformada de Fourier, de maneira a transformar este gráfico num gráfico intensidade vs frequência, produzindo um espectro virtualmente idêntico ao que é produzido recorrendo aos espectrómetros habituais. O espectro é então obtido ao aplicar a transformada de Fourier ao interferograma (Perkins, 1986).

Outros parâmetros como o teor de açúcares, cobre, ferro e ácido cítrico são também determinados de forma instrumental, recorrendo a um analisador enzimático BioSystems Y15 (Figura 28 - B), que permite obter resultados de uma forma mais célere comparativamente com os métodos analíticos oficiais definidos no *Compendium* Internacional de métodos de análise da OIV.

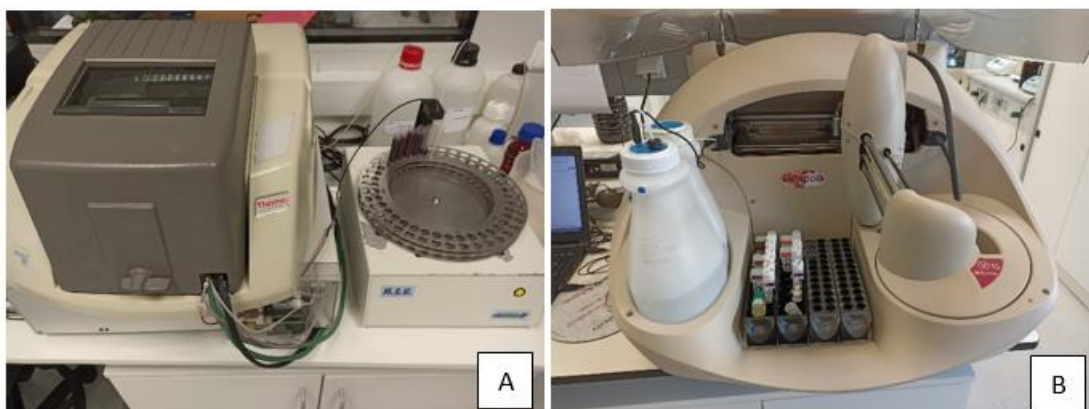


Figura 28 – Equipamento para análises sumárias do vinho em uso no laboratório da Global Wines S.A. A: analisador FTIR; B – analisador enzimático BioSystems Y15.

6.2.1. SO₂ Livre e Total

O dióxido de enxofre livre (ou anidrido sulfuroso livre) de uma bebida alcoólica ou espirituosa encontra-se normalmente sob as formas de H₂SO₃, HSO₃⁻ e SO₃²⁻.

A determinação do dióxido de enxofre livre é realizada através de uma titulação iodométrica direta com dedução das outras substâncias oxidáveis pelo iodo (usando como ácido o ácido sulfúrico e como indicador cozimento de amido), segundo a norma portuguesa relativa a este parâmetro analítico (NP-2220).

A determinação do teor de dióxido de enxofre total (também conhecida por método rápido de Ripper), consiste na titulação iodométrica em meio ácido, após dupla hidrólise alcalina na amostra cujo SO₂ livre foi oxidado (Curvelo-Garcia, 1988) (NP-2220).

O teor de dióxido de enxofre livre ou total, expresso em miligramas de SO₂ por litro, é dado por:

$$SO_2 \text{ Livre ou Total} = V * 20,$$

sendo V = o volume, em mL, da solução de iodo gasto na titulação.

No laboratório da Global Wines S.A. a determinação do dióxido de enxofre livre e total pode ser efetuada com o auxílio de uma bureta de titulação ou instrumentalmente, recorrendo a um titulador automático Titromatic 1S SO₂, da marca Crison Instruments. Contudo, o método oficial (também conhecido por método de Paul e legislado pela União Europeia) é também realizado no laboratório.

Segundo a legislação (Regulamento (CE) nº606/2009, alterado pelo Regulamento (UE) nº934/2019), o limite máximo do teor de dióxido de enxofre total no vinho é de 200 mg/L em vinhos brancos e rosés e 150 mg/L em vinhos tintos. Em vinhos com mais de 5 g/L de frutose + glucose, o limite aumenta para 250 mg/L para vinhos brancos e rosés e 200 mg/L para vinhos tintos. Por outro lado, e tratando-se de vinhos biológicos, o limite é de 150 mg/L em vinhos brancos e rosés e de 100 mg/L para vinhos tintos. No caso dos vinhos espumantes, o limite máximo de SO₂ é de 185 mg/L.

6.2.2. Acidez total

Entende-se por acidez total de uma bebida alcoólica ou espirituosa a acidez titulável a pH 7, não sendo compreendida a devida ao ácido carbónico e ao dióxido de enxofre livre e combinado (Curvelo-Garcia, 1988). É necessário então determinar e descontar os teores relativos a estes ácidos, devido ao emprego do SO₂ como conservante, bem como da dissolução do CO₂ decorrente da fermentação alcoólica,

que levam, involuntariamente, a um ligeiro aumento da acidez total e volátil (Alpuim, 1997).

A acidez total pode também ser conhecida, junto da comunidade enológica, como a soma da acidez fixa com a acidez volátil.

Resumidamente, o processo consiste numa neutralização dos ácidos presentes no vinho por solução alcalina (hidróxido de sódio 0,1N), utilizando o azul de bromotimol como indicador. A titulação decorre até à amostra apresentar uma cor azul-esverdeada (NP-2139).

A acidez total de um mosto e/ou vinho, expressa na quantidade de ácido tartárico por dm^3 , é dada pelo cálculo de:

$$AT = V * 0,75 \text{ (Equação 1),}$$

Sendo V = o volume, em mL, da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação.

Segundo a legislação (Regulamento (CE) nº491/2009), o limite mínimo do teor de acidez total no vinho é de 3,5g/L, expresso em ácido tartárico.

6.2.3. Teor alcoólico

Entende-se por teor alcoólico em volume (ou grau alcoólico volumétrico) de um vinho o número de cm^3 de etanol contidos em 100 cm^3 desse vinho, sendo estes dois volumes medidos à temperatura de 20°C.

No laboratório da Global Wines, este parâmetro é determinado recorrendo a um ebuliómetro (Figura 29 - A), que permite determinar, de forma direta o teor alcoólico de vinhos e espumantes. A determinação da temperatura de ebulição do vinho, intermédia entre a água (100°C, sob uma pressão de 760 mm de mercúrio) e a do etanol (78,4°C, sob uma pressão de 760 mm de mercúrio), está diretamente relacionada e dependente do respetivo teor alcoólico em volume (Curvelo-Garcia, 1988).

O princípio de funcionamento do ebuliómetro está dependente da pressão atmosférica. Como tal, é necessário proceder a uma determinação inicial do ponto de ebulição da água, servindo esta temperatura de referência ao utilizar o disco para ebuliómetro (Figura 29 - B) (a temperatura da água calculada será correspondente ao ponto 0 dos graus alcoólicos no disco).

Posteriormente, calcula-se a temperatura de ebulição da amostra do vinho. Com o registo desta temperatura, é possível determinar o teor alcoólico da amostra, ao verificar o grau alcoólico relativo à temperatura de ebulição da amostra, lido na escala do disco para ebuliómetro.

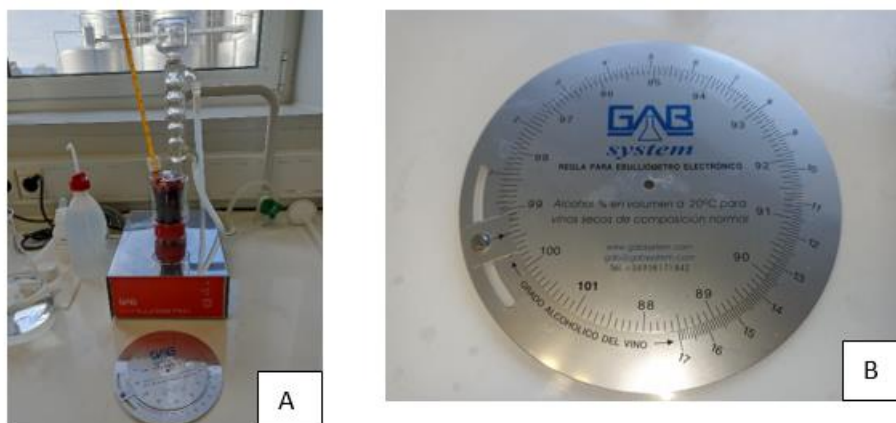


Figura 29 – Ebuliómetro elétrico GAB (A) com respetivo disco (B) para determinação do teor alcoólico, em uso no Laboratório da Global Wines S.A.

Os resultados obtidos são apresentados em percentagem de volume (% vol.).

No laboratório de Enologia da Global Wines S.A. é também realizado o método oficial reconhecido pela OIV para determinação do teor alcoólico de um vinho, que consiste numa destilação simples da amostra alcalinizada e determinação do teor alcoólico do destilado por areometria.

Os limites legais, definidos pelo Regulamento (CE) nº491/2009, para o título alcoométrico volúmico adquirido é de $\geq 9\%vol.$ no vinho tranquilo, $\geq 15\%vol.$ e $\leq 22\%vol.$ no vinho licoroso e $\geq 9,5\%vol.$ para o vinho espumante.

6.2.4. Acidez volátil

Entende-se por acidez volátil de uma bebida alcoólica ou espirituosa a parte dos ácidos gordos da série acética que nelas se encontra, quer no estado livre quer na forma de sais (Curvelo-Garcia, 1988).

O processo, tendo em conta a norma portuguesa (NP-2140), consiste na separação dos ácidos voláteis por arrastamento numa corrente de vapor de água, seguida de retificação, condensação e titulação com fenolftaleína, com o cuidado de evitar a presença de CO_2 no destilado. Este processo faz-se com recurso a um aparelho de destilação (acidímetro) Cazenave-Ferré (Figura 30). Por iodometria, determina-se o SO_2 arrastado, juntamente com os ácidos voláteis, o que permite determinar a acidez volátil corrigida.

A acidez volátil é expressa em g/L em ácido acético, o ácido volátil mais presente no vinho. O teor em ácido acético é indicativo do “estado de saúde” do vinho bem de possíveis problemas que tenham ocorrido na sua produção, daí a extrema importância da realização desta análise (Alpuim, 1997).

Segundo a legislação (Regulamento (CE) nº606/2009), um vinho pode apresentar até um teor máximo de 18 meq/L (1,08 g/L) de ácido acético nos vinhos brancos e rosados e até 20 meq/L (1,2 g/L) nos vinhos tintos.



Figura 30 – Aparelho de destilação Cazenave-Ferré, para determinação da acidez volátil em vinhos, em uso no laboratório da Global Wines S.A.

6.2.5. Massa volúmica e Extrato seco (a 20°C)

A massa volúmica é o quociente entre a massa de um determinado volume de vinho ou mosto a 20°C e esse volume. Exprime-se em gramas por mililitro e o seu símbolo é $\rho^{20^\circ\text{C}}$. Por outro lado, designa-se por extrato seco total de um vinho o conjunto de todas as substâncias que não se volatilizam, em condições físicas tais que os componentes desse extrato sofram o mínimo de alteração (Iland, 2004).

A massa volúmica é determinada na amostra com recurso a um areómetro calibrado e por medição da temperatura da amostra, corrigida posteriormente a 20°C.

Este parâmetro analítico encontra-se legislado no Regulamento nº2676/90, que determina os métodos de análise comunitários aplicáveis no sector do vinho.

6.2.6. Determinação do pH

Pode definir-se pH (ou acidez real) a “disponibilidade atual” (concentração) de iões H^+ no vinho.

Trata-se de um método potenciométrico, baseado na determinação da diferença de potencial dada por um eléctrodo combinado (eléctrodo de referência, com potencial fixo e conhecido e eléctrodo de medida, com um potencial que é uma função definida do pH do vinho) imerso no meio em análise (Curvelo-Garcia, 1988) (Regulamento (CEE) nº2676/90).

Normalmente o vinho apresenta um valor de pH ácido, variando entre cerca de 2,8 e 3,8 (Alpuim, 1997), sendo que este valor pode variar ao longo da produção do mesmo, quer nas etapas fermentativas quer na etapa de conservação.

O pH do vinho é um parâmetro analítico muito importante, uma vez que influencia a estabilidade microbiana e a resistência à oxidação durante a vinificação, assim como controla muitos dos processos químicos que acabam por influenciar as características sensoriais presentes no vinho (Alpuim, 1997; Butzke, 2010).

No laboratório de Enologia da Global Wines S.A. o valor de pH de determinada amostra é medido recorrendo a um potenciómetro Hach Sension+pH3 (Figura 31 -A).

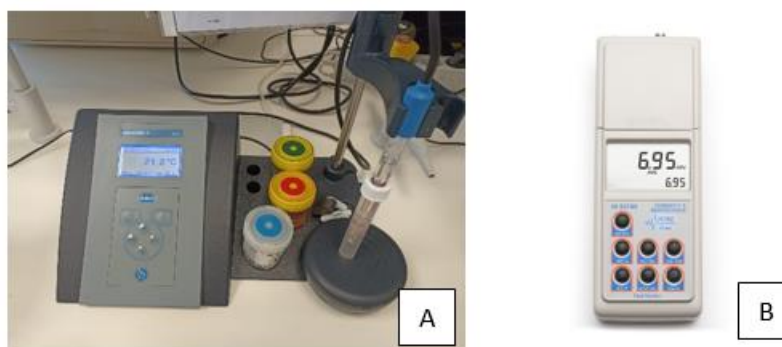


Figura 31 – A: Potenciómetro Hach Sension+pH3 para determinação do pH em vinho; B – Turbidímetro HI83749 (Hanna Instruments) para determinação da turbidez em vinho.

6.2.7. Turbidez

A turbidez é uma medida que permite determinar o grau de sólidos suspensos no vinho, indicando o seu estado de clarificação.

Este parâmetro analítico é determinado recorrendo à utilização de um turbidímetro que mede o desvio da luz provocado pelas partículas em suspensão após a passagem de um feixe de luz numa célula de vidro transparente. Quanto maior o valor da turbidez, mais partículas sólidas se encontram em suspensão (Iland et al., 2004).

A unidade de turbidez é NTU (*Nephelometric Turbidity Units* – unidades nefelométricas de turbidez).

No laboratório de Enologia da Global Wines S.A. este parâmetro analítico é determinado recorrendo a um turbidímetro HI83749, da marca Hanna (FIGURA 31 - B) e tendo por base o método oficial descrito pela OIV (OIV-MA-AS2-08).

7. Aplicação de métodos de análise microbiológica

a) Análise microbiológica de controlo de engarrafamento de vinhos

Ao longo do processo de produção de vinhos tranquilos, encontram-se implementadas algumas etapas com vista à estabilização microbiológica: no caso de vinhos brancos e rosés a filtração esterilizante por membrana e o tratamento térmico (engarrafamento a quente) no caso de vinhos tintos.

Como já referido no ponto 6.1., na empresa Global Wines S.A. é realizado o controlo microbiológico dos vinhos tranquilos engarrafados, com a pesquisa e contagem de leveduras e bolores (UFC/100 ml de amostra).

Com o objetivo de validar os métodos utilizados na estabilização microbiológica dos vinhos tranquilos engarrafados na empresa, foram recolhidas, ao longo do período de estágio, 26 amostras de vinhos (9 vinhos brancos, 2 vinhos rosés e 15 vinhos tintos) antes de serem submetidos a uma filtração por membrana, no caso dos vinhos brancos e rosés, ou serem pasteurizados, no caso do vinho tinto.

O controlo microbiológico desses mesmos vinhos já engarrafados, e realizado de acordo com o Plano de Controlo e Análise da empresa (referido em 6.1.) foi registado, para possível comparação entre amostras em fases diferentes do processo de produção. Tendo em conta que o objetivo principal dos métodos de estabilização microbiológica em vinhos é eliminar os microrganismos presentes em suspensão, considerou-se neste estudo somente a deteção de bolores e leveduras nas amostras recolhidas, embora tenha sido efetuada a respetiva contagem das colónias presentes (em UFC/100 ml) nas placas inoculadas, estando os dados recolhidos compilados no Anexo V. Na tabela 3, são apresentados os resultados obtidos neste estudo:

Tabela 3 – Resultados da amostragem antes e após a estabilização microbiológica dos vinhos tranquilos na Global Wines S.A.

	Antes da estabilização microbiológica		Após a estabilização microbiológica	
	Presença ¹	Ausência ²	Presença ¹	Ausência ²
Vinho Tinto	15/15 (100%)	0/15	0/15	15/15 (100%)
Vinho Rosé	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Vinho Branco	9/9 (100%)	0/9	2/9 (22,2%)	7/9 (77,8%)

¹Presença de colónias de leveduras e bolores na placa inoculada com meio de cultura WLN

²Ausência de colónias de leveduras e bolores na placa inoculada com meio de cultura WLN

Da observação dos resultados obtidos, verifica-se que, de uma forma geral, os tratamentos (filtração e térmicos) de estabilidade microbiológica foram eficientes na redução e eliminação dos microrganismos presentes em suspensão. Isto é facilmente perceptível nas amostras referentes aos vinhos engarrafados, com o decréscimo no número de colónias presentes nas placas inoculadas.

Foram detetadas algumas colónias nas amostras de vinho branco engarrafado. Contudo, tendo em conta a contagem dos microrganismos efetuada aquando da observação das placas inoculadas (Anexo V e Figura 32 - B), é perceptível a redução nas colónias presentes antes e após a passagem pelo filtro de membranas. A contagem das colónias encontra-se também abaixo dos limites máximos para os parâmetros microbiológicos definidos a nível interno na empresa (referidos em 6.1.) pelo que não é relevante numa possível perda da qualidade alimentar do produto final.

Relativamente às amostras de vinho tinto (um exemplo na Figura 32 - A), conclui-se que o engarrafamento a quente é um método bastante eficaz na eliminação de microrganismos indesejáveis na produção de vinhos, indo de encontro ao referenciado na literatura (e referido em 5.3.) e ao histórico de análises efetuadas na empresa, com a totalidade das amostras de vinho engarrafado a não registarem a presença de colónias de leveduras e bolores contaminantes.

Ao comparar os resultados obtidos para as amostras de vinho branco e vinho tinto, pode tirar-se algumas conclusões quanto à eficácia dos métodos de estabilização microbiológica em vigor para cada tipo de vinho. De facto, o engarrafamento a quente nos vinhos tintos que, permite a eliminação de todos os microrganismos em suspensão, é mais eficiente que o tratamento físico – filtração em membrana – aplicado aos vinhos rosés e brancos. Na filtração em membrana não é promovida a eliminação dos microrganismos, mas sim a retenção dos mesmos na membrana filtrante, sendo possível a permeabilidade a microrganismos de tamanho inferior à porosidade da membrana (0,45 μm).

No que toca ao vinho rosé, não se pode tirar qualquer tipo de ilações relativamente aos resultados obtidos, devido à pequena amostragem (apenas 2 amostras) recolhida para este tipo de vinho.

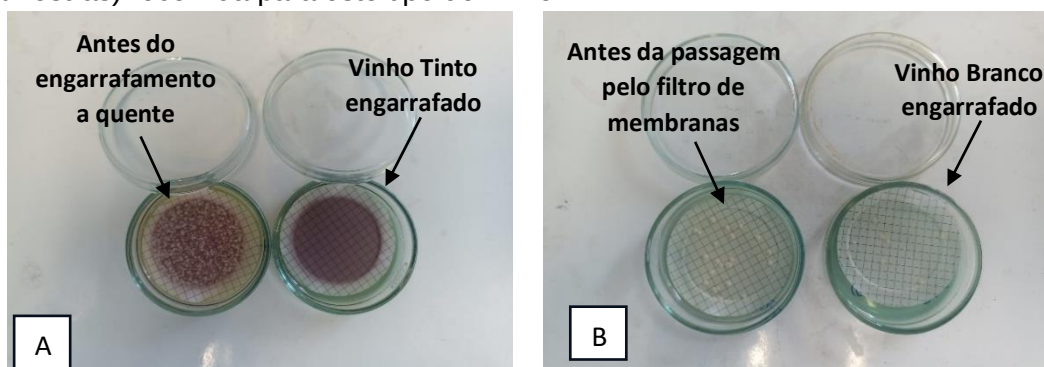


Figura 32 – Observação visual das placas inoculadas com as amostras em estudo, recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana. As amostras foram recolhidas antes e após a estabilização microbiológica, com vista à pesquisa de bolores e leveduras: A – amostra de vinho tinto; B – amostra de vinho branco.

b) Análise microbiológica na etapa de tiragem na produção de vinhos espumantes

A tiragem é uma etapa essencial para garantir o sucesso da segunda fermentação em garrafa, na produção de vinhos espumantes segundo o método clássico.

O período em que decorreu este estágio coincidiu com a etapa de tiragem na empresa Global Wines S.A., realizada entre fevereiro e março de 2023.

O trabalho efetuado, no âmbito deste estágio, focou-se no controlo da higienização da linha de tiragem, um pequeno estudo sobre a qualidade microbiológica do ar/ambiente da enchedora, bem como o controlo microbiológico em vários pontos da linha de tiragem, de acordo com o Plano de Controlo e Análise em vigor na empresa.

Tal como referido em 3.2.2., é necessário garantir, diariamente e antes de iniciar a produção, que toda a linha de enchimento e enxaguamento se encontra devidamente higienizada.

Para tal, foi efetuado o controlo do processo de higienização de toda a linha de tiragem, antes da mesma arrancar, através da deteção de moléculas de adenosina trifosfato (ATP), molécula energética presente em todas as células animais, vegetais, bem como em leveduras e bolores, com recurso a uma zaragatoa de superfícies UltraSnap e um luminómetro (Ensure Touch, da Hygiena) (Figura 33 - A).

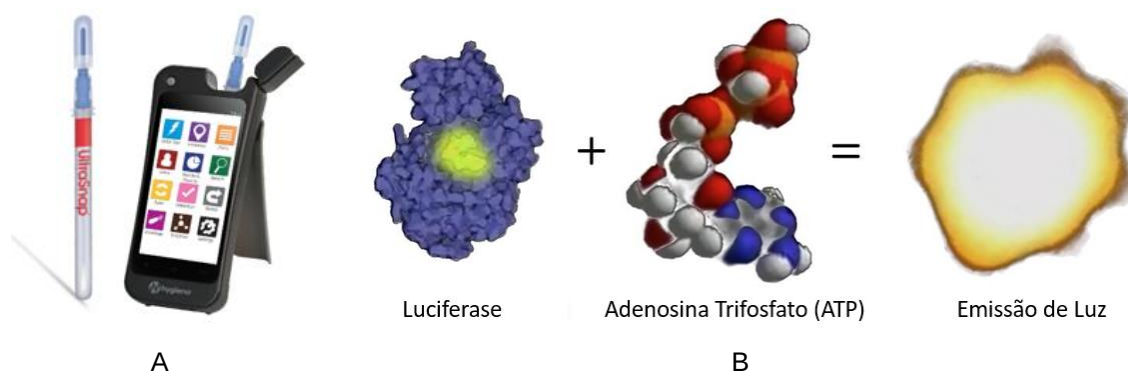


Figura 33 – Controlo da higienização com recurso à bioluminescência A – Equipamento: Zaragatoa UltraSnap e Luminómetro Ensure Touch (Hygiena); B: Representação esquemática da reação química entre a molécula de ATP e a enzima luciferase, através da emissão de luz que será lida pelo luminómetro.

Este método tem por base o conhecimento de que todos os resíduos de matéria orgânica presentes nas superfícies contêm ATP, assim como qualquer contaminação microbiana existente e que ao efetuar uma higienização adequada, a percentagem de ATP deveria reduzir consideravelmente. Ao recolher a amostra e colocando-a em contacto com o reagente luciferase existente na parte líquida do kit, vai ser emitida uma luz que é diretamente proporcional à quantidade de ATP presente na amostra

(Figura 33 - B). O luminómetro é utilizado posteriormente para ler a luz gerada na reação anterior. O resultado é expresso em unidades relativas de luz – RLU.

A interpretação dos resultados tem em conta os limites padronizados definidos pelo próprio equipamento, baseando-se em estudos anteriores sobre esta temática (Tabela 4). Ter em conta que quanto mais alto o valor de RLU, maior será a presença de ATP e, portanto, mais suja estará a superfície e uma maior percentagem de microrganismos poderá se encontrar presente na mesma.

Tabela 4 - Limites de aprovação e reprovação, da leitura de RLU pelo luminómetro Ensure Touch (Hygiena), recorrendo à Zaragatoa UltraSnap.

0-20 RLU	Aprovado. A superfície é considerada limpa.
21-59 RLU	Atenção. A superfície não está adequadamente limpa.
> 60 RLU	Reprovado. A superfície é considerada suja.

Foi controlada a higienização diária da linha de tiragem, com a realização do teste ATP com zaragatoa UltraSnap em dois pontos distintos da enchedora: um bico de enchimento e o interior da enchedora (após desmontagem de um dos bicos de enchimento). Após aprovação no teste, é dada luz verde para o enchimento do vinho base, a adição das leveduras encapsuladas e a capsulagem.

Da observação da tabela (Tabela 5) e das leituras diárias (Anexo VI) relativas ao controlo da higienização da linha de tiragem durante 22 dias de produção, denota-se que a higienização por parte dos operadores de engarrafamento foi bem-sucedida em 20 dias de tiragem, com os resultados positivos a demonstrarem que as superfícies se encontravam devidamente limpas, possibilitando assim o normal funcionamento da linha.

Tabela 5 – Controlo da higienização da linha de tiragem, com recurso ao teste de ATP em zaragatoa UltraSnap e respetiva leitura de RLU em luminómetro Ensure Touch. A tiragem decorreu durante 22 dias de produção (03.02.2023 a 09.03.2023).

	0-20 RLU	21-59 RLU	> 60 RLU
Bico da enchedora	21*/22	0/22	1*/22
Interior da enchedora	21*/22	0/22	1*/22

*>60 RLU (Reprovado) em dias diferentes para o bico e o interior da enchedora.

Contudo, em 2 dias de tiragem, verificou-se uma leitura não conforme (>60 RLU) no teste de ATP efetuado a um dos bicos e ao interior da enchedora, respetivamente. Este resultado permitiu concluir, de imediato, que a enchedora não se encontrava devidamente higienizada. Em conjunto com a equipa de Produção, decidiu-se, como medida corretiva, a necessidade de proceder a uma nova passagem de água de enxaguamento até o resultado se encontrar dentro dos padrões de aprovação (<20

RLU). Após duas passagens de água de enxaguamento, atingiu-se os resultados esperados, dando-se então luz verde ao normal funcionamento da linha de tiragem.

Fica assim comprovado a necessidade de efetuar um controlo rigoroso da higienização na linha de enchimento antes do arranque, com o objetivo de reduzir ao máximo as possíveis contaminações microbianas no vinho base, com origem numa má higienização ou numa higienização incompleta do equipamento de enchimento, evitando assim colocar em causa o sucesso da segunda fermentação em garrafa.

Por solicitação da equipa da Qualidade da empresa Global Wines S.A., foi também realizado um pequeno estudo ao ambiente/ar dentro da enchedora, com o objetivo de averiguar a eficácia do sistema de esterilização do ar existente no equipamento, responsável por garantir um ambiente assético no processo de enchimento na etapa de tiragem.

Colocaram-se placas de exposição (com meio de cultura WLN Agar para deteção de bolores e leveduras), em duplicado, num lugar estratégico dentro do equipamento de enchimento, no momento do arranque da linha. Após 15-30 minutos as placas foram recolhidas e incubadas a 35°C, durante 18-48 horas, período após o qual se contabilizou e registou as possíveis colónias de leveduras e fungos presentes nas placas expostas (Anexo VI).

Analisando os resultados obtidos (Tabela 6), verificou-se a manutenção de um ambiente assético durante a maior parte do período de estudo, correspondente a 18 dias de produção desta linha, através da observação da ausência de contaminações em 16 das 18 placas inoculadas (88,9%), bem como nas placas em duplicado, com 15 placas das 18 (83,3%) a não registarem crescimento microbiano.

É comum encontrar em suspensão no ar vários agentes biológicos, tais como parasitas, bactérias, leveduras, fungos e vírus (Oliveira et al., 2020). Tendo isto em mente, é de extrema importância garantir que o ambiente em que decorre o enchimento do vinho base e a posterior adição de leveduras encapsuladas é o mais assético possível, de forma a evitar qualquer contaminação indesejável, tornando-se necessário o controlo regular do ambiente em que decorre a etapa de tiragem.

Tabela 6 – Resultados do estudo ao ambiente/ar da enchedora na etapa de tiragem da produção de vinhos espumantes na Global Wines S.A., recorrendo a placas de exposição.

	Placas de exposição no ambiente/ar da enchedora	
	Presença ¹	Ausência ²
Placa 1	2/18 (11,1%)	16/18 (88,9%)
Placa 2 (duplicado)	3/18 (16,6%)	15/18 (83,3%)

¹Presença de colónias de leveduras e bolores na placa inoculada com meio de cultura WLN

²Ausência de colónias de leveduras e bolores na placa inoculada com meio de cultura WLN

De acordo com o Plano de Controlo e Análise da empresa Global Wines S.A., a etapa de tiragem é controlada do ponto de vista microbiológico, com a recolha de amostras em vários pontos do processo (Figura 34):



Figura 34 – Plano de controlo e análise microbiológica para a etapa de tiragem no processo de produção de espumantes na empresa Global Wines S.A., com referência aos pontos de recolha das amostras.

A recolha de amostras nestes pontos estratégicos da linha permite controlar e descartar possíveis contaminações com origem no vinho base, numa má higienização das garrafas ou da enchedora. Permite também, caso se verifiquem contaminações microbianas, tomar medidas corretivas, que possam reduzir o insucesso na segunda fermentação em garrafa e diminuir o risco de possíveis perdas económicas no processo de produção de espumantes.

O controlo microbiológico da linha de tiragem, durante os 22 dias de produção (Anexo VI; Tabela 7) permite concluir que a etapa de tiragem decorreu sem grandes problemas do ponto de vista microbiológico, com a ausência de contaminações ao longo do processo.

Tabela 7 – Resultados do controlo microbiológico da etapa de tiragem do processo de produção de espumantes na Global Wines S.A., recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana.

	Controlo microbiológico da linha de tiragem	
	Presença ¹	Ausência ²
Antes do filtro de membranas (Figura H-1)	18/22 (81,8%)	4/22 (18,2%)
Após o filtro de membranas (Figura H-2)	0/22	22/22 (100%)
Garrafa Enxaguada (Figura H-3)	0/22	22/22 (100%)
Vinho base sem leveduras (Figura H-4)	0/22	22/22 (100%)
Vinho base com leveduras – Arranque (Figura H-5)	0/22	22/22 (100%)
Vinho base com leveduras – 2h (Figura H-5)	0/22	22/22 (100%)
Vinho base com leveduras – 4h (Figura H-5)	0/19	19/19 (100%)
Vinho base com leveduras – 6h (Figura H-5)	0/4	4/4 (100%)

¹Presença de colónias de leveduras e bolores na placa inoculada com meio de cultura WLN

²Ausência de colónias de leveduras e bolores na placa inoculada com meio de cultura WLN

É de destacar a presença de contaminações microbianas (presença de leveduras) no vinho base antes de ser submetido a uma estabilização microbiológica, recorrendo a um filtro de membranas esterilizante. Verificando-se a inexistência de crescimento microbiano nas placas inoculadas com o vinho base após a passagem no filtro, é comprovada a extrema importância de incluir uma etapa de estabilização microbiológica antes de adicionar as leveduras encapsuladas, para impedir o crescimento de leveduras indesejáveis e garantir que somente as leveduras que se adicionaram serão as responsáveis por garantir a segunda fermentação em garrafa.

c) Controlo microbiológico do processo de higienização

No âmbito deste estágio, foi também realizado um controlo microbiológico ao processo de higienização a nível das operações de adega, nomeadamente aos depósitos de estágio de vinho, bem como ao equipamento de filtração de terras. Este estudo decorreu de janeiro a abril de 2023.

Numa parte inicial, o processo da higienização em adega foi acompanhado e controlado, através da recolha de amostras por esfregaço com zaragatoa de superfícies, ideal para a recuperação de maior parte dos microrganismos contaminantes de superfícies. A zaragatoa em causa, após esfregaço, foi mergulhada num tubo contendo 10 ml de neutralizante, posteriormente diluídos em 100 ml de água autoclavada e filtrados segundo o método de análise microbiológico de filtração em membrana, descrito no capítulo 6.1. As placas com meio de cultura WLN, para deteção de bolores e leveduras, foram incubadas, em duplicado para cada amostra, durante 18-48 horas a 35°C, sendo posteriormente observadas e registados os resultados obtidos.

Foram recolhidas amostras em quatro pontos estratégicos dos depósitos de estágio de vinho (Figura 35), imediatamente após o processo de higienização levado a cabo pelos operadores de adega.

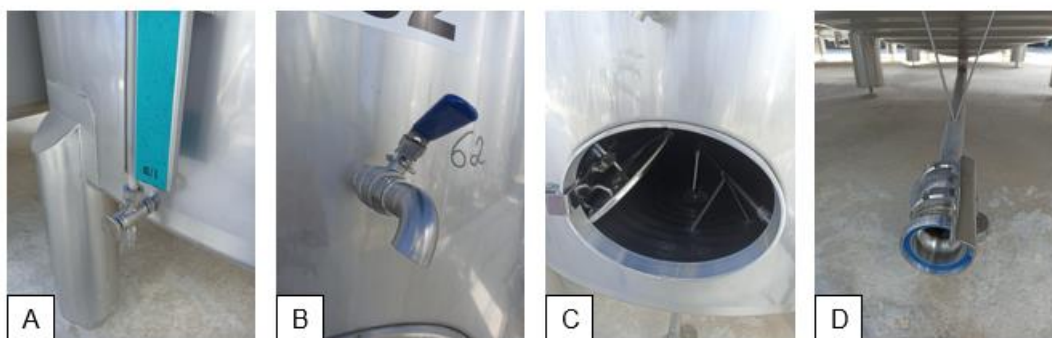


Figura 35 – Pontos de recolha de amostras, por esfregaço com zaragatoa de superfícies, para controlo microbiológico do processo de higienização em adega: A – escala graduada; B – provadeira; C – interior do depósito; D – torneira do depósito.

Mais uma vez o objetivo de uma boa higienização é eliminar os microrganismos presentes na superfície higienizada. Sendo assim, procedeu-se à pesquisa dos mesmos nas placas inoculadas (Tabela 8) (a contagem dos microrganismos em UFC/100 ml encontra-se descrita no Anexo VII).

Tabela 8 – Resultados do controlo microbiológico do processo de higienização em operações de adega na empresa Global Wines S.A., recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana.

Controlo microbiológico do processo de higienização				
Janeiro 2023		Fevereiro-Março 2023		
	Presença¹	Ausência²	Presença¹	Ausência²
Provadeira	3/4 (75%)	1/4	6/11 (54,5%)	5/11
	3/4 (75%)	1/4	6/11 (54,5%)	5/11
Escala graduada	2/4 (50%)	2/4	8/11 (72,7%)	3/11
	2/4 (50%)	2/4	6/10 (60%)	4/10
Interior do depósito	2/4 (50%)	2/4	3/11 (27,3%)	8/11
	2/4 (50%)	2/4	3/11 (27,3%)	8/11
Torneira do depósito	1/4 (25%)	3/4	4/11 (36,4%)	7/11
	1/4 (25%)	3/4	3/11 (27,3%)	8/11

¹Presença de colónias de leveduras e bolores na placa inoculada com meio de cultura WLN

²Ausência de colónias de leveduras e bolores na placa inoculada com meio de cultura WLN

Da análise geral dos resultados obtidos (Tabela 8), verificou-se uma presença de contaminações microbianas em mais de metade das amostras com origem na provadeira e na escala graduada dos depósitos, comparativamente com as amostras com origem no interior e na torneira do depósito.

A provadeira e a escala graduada são zonas críticas dos depósitos, de difícil higienização e onde facilmente se acumulam resíduos de vinho e restos de matéria orgânica. Como tal, devem ser alvo de atenção máxima aquando da sua limpeza e desinfeção.

Na figura 36 é apresentado um exemplo das placas inoculadas respeitantes a um dos depósitos higienizados da adega da Global Wines S.A., onde é notório o crescimento microbiano nas placas inoculadas com amostras com origem na provadeira e na escala graduada do depósito.

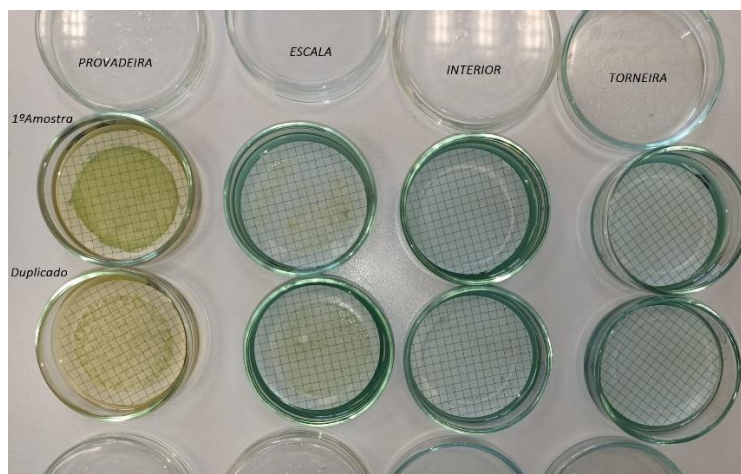


Figura 36 – Observação visual das placas inoculadas com as amostras em estudo, recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana. As amostras foram recolhidas através de esfregaço com zaragatoa de superfícies, após a higienização dos depósitos da adega.

O propósito maior de controlar a higienização em adega, no âmbito deste estágio, foi precisamente dar suporte à equipa de enologia e adega, nomeadamente na tomada de decisões, com o intuito de proporcionar higienizações cada vez mais completas e bem-sucedidas, garantindo assim diminuir ao máximo o risco de contaminações cruzadas.

Como tal, os resultados obtidos nesta primeira parte do estudo foram constantemente monitorizados, com o objetivo de proceder a medidas corretivas no processo de higienização ao longo do tempo. Algumas das medidas postas em prática foram:

- ✓ Desmontagem e desinfeção manual do equipamento da provadeira e escala graduada, tendo em conta serem locais críticos e de acumulação de matéria orgânica;
- ✓ A utilização de um escovilhão como auxiliar da higienização da provadeira e da escala graduada;
- ✓ Utilização de um detergente ácido (à base de ácido peracético), com maior capacidade bioácida, comparativamente com a utilização de um detergente cáustico ou detergente desinfetante alcalino.

Numa segunda fase do estudo, foi efetuado o controlo da higienização, já após a tomada de decisões e implementação de medidas corretivas. Contudo, em vez de recorrer à recolha de amostras por esfregaço com zaragatoa de superfícies com vista à análise microbiológica, optou-se pela realização de um teste ATP em zaragatoa UltraSnap e respetiva leitura de RLU num luminómetro (Tabela 9; Anexo VII), tal como já havia sido efetuado para o controlo da higienização da linha de tiragem no processo

de produção de vinhos espumantes. Este método alternativo permite resultados mais rápidos e a tomada de decisões no imediato.

Tabela 9 – Controlo da higienização da linha de tiragem, com recurso ao teste de ATP em zaragatoa UltraSnap e respetiva leitura de RLU em luminómetro Ensure Touch.

Controlo do processo de higienização dos depósitos da adega – Teste de ATP-bioluminescência			
	0-20 RLU	21-59 RLU	> 60 RLU
Provadeira	14/16 (87,5%)	2/16 (12,5%)	0/16
Escala graduada	6/16 (37,5%)	4/16 (25%)	6/16 (37,5%)
Interior do depósito	16/16 (100%)	0/16	0/16
“Boca” da mangueira	13/16 (81,25%)	2/16 (12,5%)	1/16 (6,25%)

Após as medidas corretivas, e através da análise pelo método de bioluminescência, continua a ser notório a possível presença de contaminações microbiológicas na escala graduada dos depósitos da adega higienizados, devido aos elevados valores de RLU (>60) na escala em 6 dos 16 depósitos higienizados. Os valores obtidos por este método estão em concordância com os resultados observados pelo método de análise microbiológica, com a escala graduada a ser o local com maior possibilidade de contaminações microbiológicas, mesmo após ocorrer o processo de higienização.

Por outro lado, as medidas postas em prática pela equipa de adega, parecem ter sido eficientes no que toca à higienização da provadeira. Neste sentido, a equipa da adega foi aconselhada a continuar a dedicar uma atenção especial a esta zona do depósito, pondo em práticas as medidas acima referidas.

O interior do depósito é o local com menos contaminações microbianas, nos resultados de ambos os métodos de análise escolhidos. Estas observações fazem sentido, visto ser o local que mais tempo está em contacto com os agentes químicos e com a água de enxaguamento, em comparação com os restantes locais de recolha de amostras, tendo em conta que a higienização decorre num sistema aberto com recurso a uma bomba de vácuo (*clean in place*).

A par do controlo da higienização dos depósitos da adega, foi também efetuado o controlo da higienização antes da utilização do filtro de terras.

Neste caso, foram recolhidas amostras em quatro pontos estratégicos do filtro de terras (Figura 37), imediatamente após ocorrer a higienização por parte dos

operadores da adega. A análise das amostras recolhidas foi efetuada da mesma forma que no controlo microbiológico da higienização dos depósitos.

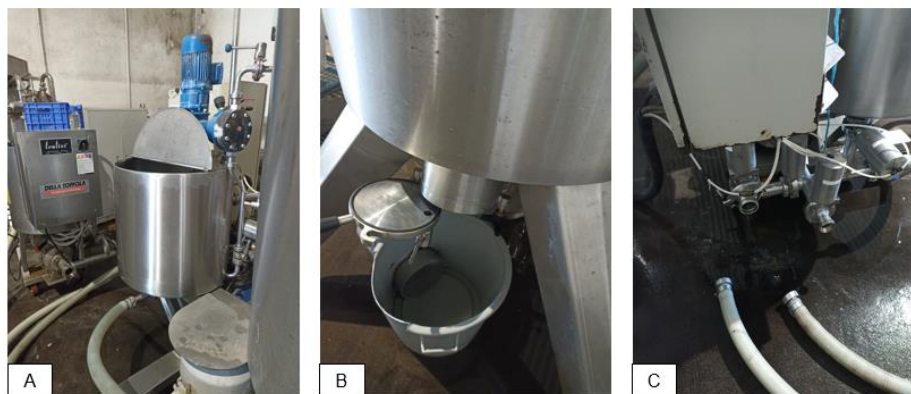


Figura 37 – Pontos de recolha de amostras, por esfregaço com zaragatoa de superfícies, para controlo microbiológico do processo de higienização no filtro de terras: A – interior do filtro de terras; B – saída de terras; C – entrada e saída do vinho no filtro de terras.

Da observação dos resultados (Tabela 10), verificou-se a presença de contaminações nas placas com meio de cultura de bolores e leveduras, inoculadas a partir das amostras respeitantes à entrada e saída do vinho no filtro de terras, bem como, no interior do próprio filtro.

Tal como ocorrido na higienização dos depósitos, foram tomadas algumas medidas corretivas ao longo do estudo, como uma passagem extra de água de enxaguamento ou a utilização de um desinfetante ácido. Neste caso, as medidas foram eficientes, com as duas últimas recolhas (dia 07.03 e 20.03) a não registarem qualquer tipo de contaminação nas placas observadas (Anexo VII).

Tabela 10 – Resultados do controlo microbiológico do processo de higienização no filtro de terras na empresa Global Wines S.A., recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana.

Controlo microbiológico do processo de higienização – filtro de terras		
	Presença¹	Ausência²
Entrada do vinho no filtro de terras	3/5 (60%)	2/5
	3/5 (60%)	2/5
Saída do vinho no filtro de terras	2/5 (40%)	3/5
	2/5 (40%)	3/5
Interior do filtro de terras	1/5 (20%)	4/5
	1/5 (20%)	4/5
Porta inferior (saída de terras)	0	5/5
	0	5/5

¹Presença de colónias de leveduras e bolores na placa inoculada com meio de cultura WLN

²Ausência de colónias de leveduras e bolores na placa inoculada com meio de cultura WLN

Foram também colocadas placas de exposição, em duplicado, durante cerca de meia hora junto ao ambiente do filtro de terras, num dos dias de recolha de amostras para controlo microbiológico do processo de higienização (01.03). As placas foram posteriormente incubadas a 35°C durante 18-48 horas, seguindo-se a sua observação para possível deteção de bolores e leveduras.

O filtro de terras encontra-se localizado num local de passagem de operadores e máquinas. Sendo assim, esta pequena amostragem teve como objetivo avaliar a qualidade do ar/ambiente circundante ao filtro de terras.

Da observação das placas incubadas, registou-se a presença de oito leveduras e dois bolores na 1ª placa e duas leveduras na placa em duplicado (Figura 38). Seria necessário um estudo mais detalhado e com uma maior amostragem que permitisse tirar conclusões relativamente à relação entre as contaminações detetadas no controlo da higienização e os resultados observados nas placas de exposição.

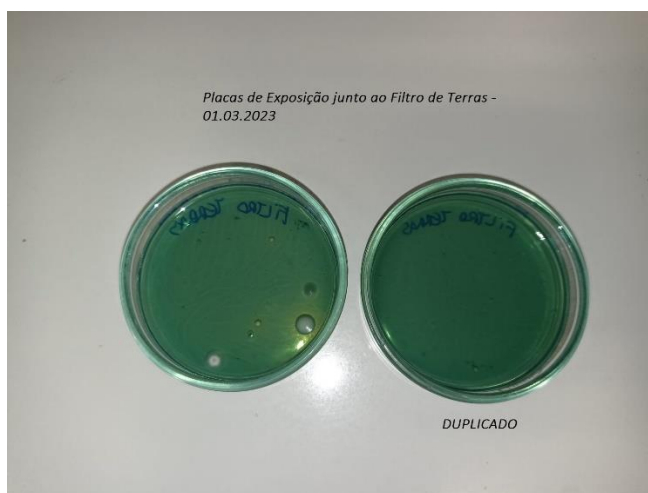


Figura 38 – Observação visual das placas de exposição com meio de cultura WLN para deteção de bolores e leveduras, colocadas durante 15 minutos junto ao ambiente do filtro de terras e posteriormente inoculadas a 35°C durante 48 horas.

Sugestões de melhoria

Os resultados obtidos ao longo deste estágio foram de extrema importância e contribuição para o trabalho diário levado a cabo pela equipa de Enologia e Produção e na Global Wines S.A., nomeadamente no que toca à verificação dos métodos microbiológicos já implementados no processo, bem como no controlo dos vários processos de higienização. Com vista à melhoria contínua e à otimização dos recursos e processos, são sugeridas algumas medidas e possíveis estudos a serem implementados e desenvolvidos na empresa e decorrentes dos resultados alcançados neste estágio.

No laboratório da empresa Global Wines S.A, qualquer amostra é analisada, microbiologicamente, recorrendo a métodos culturais para pesquisa e contagem de microrganismos, indo de encontro ao descrito no Plano de Controlo e Análise em vigor na empresa. Embora os métodos culturais continuem a ser os mais utilizados em análise microbiológica alimentar, estes apresentam algumas desvantagens, como não determinar as estirpes de leveduras e/ou bactérias envolvidas numa determinada contaminação nem permitir detetar colónias viáveis não cultiváveis. Neste sentido, a ausência de colónias de bolores e leveduras em placa, não significa que o vinho se encontra isento de microrganismos, que podem acabar por causar alterações organoléticas ao longo do tempo.

Tendo isto em vista, seria interessante a aplicação de métodos mais sofisticados de pesquisa e contagem de microrganismos, nomeadamente métodos moleculares (PCR ou citometria de fluxo), que permitisse um estudo mais aprofundado dos bolores, bactérias e leveduras habitualmente presentes no vinho e espumante produzido na empresa, assim como, nas superfícies e equipamentos (depósitos) em adega. A criação de uma base de dados da microbiota característica dos vinhos Global Wines S.A. (estirpes mais dominantes e recorrentes) permitiria uma ação muito mais rápida e eficiente no caso de uma possível situação de contaminação, podendo evitar perdas económicas para a empresa.

Decorrente dos resultados obtidos no controlo da higienização em adega realizado no âmbito deste estágio, sugere-se colocar em prática no Plano de Controlo e Análise e/ou Plano de Higienização da empresa, a realização de um controlo microbiológico periódico à higienização dos depósitos destinados a estágio de vinho em adega, bem como, a utilização de testes de bioluminescência pelo menos duas vezes por semana em depósitos higienizados, com vista à monitorização do processo e, ainda, em depósitos higienizados destinados a receber alguns vinhos especiais, nomeadamente vinhos biológicos e vinhos com intensidade corante elevada.

Seria também interessante aprofundar o estudo efetuado neste trabalho relativamente ao controlo da higienização, mas tendo em conta a aplicação de vários tipos de agentes químicos detergentes e/ou desinfetantes e o tempo de aplicação vs. percentagem de detergente/desinfetante aplicado, com vista à otimização dos produtos utilizados e a uma higienização bastante mais eficaz e, se possível, mais rápida.

Conclusão

A empresa Global Wines S.A. tem primado pela excelência na qualidade dos vinhos que produz e comercializa, sempre com a satisfação final do consumidor em primeiro plano. Com este estágio, foi possível acompanhar o dia a dia dos profissionais que trabalham nesta casa e verificar, *in loco*, o trabalho notável realizado diariamente e que permite produzir dos melhores vinhos tranquilos e espumantes da região vitivinícola do Dão.

A produção de vinhos tranquilos e espumantes é bastante complexa e morosa, com várias etapas no seu processo, nas quais o laboratório da empresa Global Wines S.A. contribui positivamente ao realizar todas as análises físico-químicas e microbiológicas solicitadas pelas equipas de Enologia e Produção da empresa. Ao estar diariamente no laboratório, foi possível acompanhar este trabalho, auxiliando a equipa do laboratório em todas as análises solicitadas, percebendo, na primeira pessoa, o papel imprescindível do mesmo no sucesso de todo o processo produtivo.

Na empresa Global Wines S.A., encontram-se implementada uma etapa de estabilização microbiológica nos vinhos produzidos, nomeadamente antes de proceder à etapa de engarrafamento. Com o estudo realizado ao longo do período de estágio, foi possível validar os métodos de análise microbiológica implementados na empresa, através da realização de análises microbiológicas que comprovaram a importância do processo de pasteurização e da existência de uma filtração em membrana para a redução e/ou eliminação da maior parte da microbiota existente nos vinhos já engarrafados e prontos a serem comercializados. Como tal, os objetivos inicialmente propostos foram cumpridos, no decorrer dos seis meses de estágio ao serviço do laboratório de enologia da Global Wines S.A.

Foi também possível acompanhar o processo de produção de espumantes, nomeadamente a etapa de tiragem, verificando a importância da análise microbiológica no controlo desta etapa, bem como a importância de uma boa higienização para o sucesso da futura segunda fermentação em garrafa, a ocorrer durante o estágio na cave da empresa.

Um controlo eficiente da higienização a vários níveis ao longo do processo de produção é muito importante para evitar possíveis contaminações microbiológicas e assim evitar perdas económicas avultadas, no decorrer de alterações indesejáveis nos vinhos produzidos. Como tal, os resultados do estudo experimental de controlo de higienização em adega efetuado no decorrer do estágio foram bastante importantes para a empresa, permitindo tomar algumas medidas corretivas ao longo do mesmo, que possibilitaram uma higienização muito mais eficaz e a identificação de algumas

zonas críticas de difícil limpeza e desinfeção e cuja atenção deverá ser redobrada aquando da higienização, para tentar evitar um elevado número de microrganismos presentes nestes locais e que possam prejudicar organoleticamente os vinhos produzidos pela empresa.

Em suma, foi um estágio bastante completo, com uma aquisição de um vasto número de conhecimentos teóricos e práticos relacionados com o controlo de processos e a produção de vinhos, bem como, o desenvolvimento de várias *soft skills*, oriundas do trabalho diário exigente e em equipa, realizado durante seis meses no laboratório de uma empresa da área alimentar.

Bibliografia

19|90 Premium Wines. (2023). *Global Wines—Do Dão para o Mundo*

Obtido a 27 de janeiro de 2023, de <https://1990.wine/quem-somos/global-wines/>

Alpuim, J. P. (1997). *Aprendendo a Química do Vinho*. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 65, 15–27.

Alves, M., Grácio, J., Simões, M., & Mira, H. (2017). *Utilização de radiação Ultravioleta (UV -C) como tecnologia alternativa aos sulfitos para a estabilização microbiológica de vinho tinto – Resultados prévios*. Revista de Ciências Agrárias, 40 (Especial), 187–194. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.19084/RCA16177>

Arnink, K., & Henick-Kling, T. (2005). *Influence of Saccharomyces cerevisiae and Oenococcus oeni Strains on Successful Malolactic Conversion in Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 56(3), 228–237. <https://doi.org/10.5344/ajev.2005.56.3.228>

ASAE. (2016, dezembro). O Vinho. ASAE news nº1047.

Obtido a 17 de fevereiro de 2023, de <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-104-dezembro-2016/o-vinho.aspx>

Bártolo, J., & Rosa, H. (2014). *Higiene na vindima*. Enovitis, 36.

Bartowsky, E. (2017). *Microbiology of winemaking*. Microbiology Australia, 38(2), 76. <https://doi.org/10.1071/MA17033>

Butzke, C. E. (Ed.). (2010). *Winemaking problems solved*. CRC Press; Woodhead Pub.

Cardoso, A. D. (2019). *O Vinho—Da uva à garrafa* (2ª Edição). Agrobook: Quântica Editora.

Cardoso, A. M. D., Neves Carvalheira, J. A., Coimbra, M. A., & Rocha, S. M. (2005). *Tecnologia dos vinhos tintos*. Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral.

Centeno, F. (2014). *Utilização de leveduras imobilizadas na produção de espumante*. XII Jornadas Técnicas, Proenol/Academia Do Vinho Verde.

Cipriano, J. (sem data). *Caraterização da Região do Dão*. Clube de Vinhos Portugueses. Obtido a 22 de fevereiro de 2023, de <https://www.clubevinhosportugueses.pt/turismo/caraterizacao-da-regiao-do-dao-2/>

Condalab. (2019). CAT n.º 1086 – WL Nutrient Agar.

Condalab. (2022). CAT n.º 2006 – Brettanomyces Agar.

- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). *Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms*. Food Microbiology, 25(2), 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.003>
- Costantini, A., García-Moruno, E., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). *Biochemical transformations produced by malolactic fermentation*. Em M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), Wine Chemistry and Biochemistry (pp. 27–57). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_2
- Costello, P. (2005). *The chemistry of malolactic fermentation*. Em Malolactic fermentation in wine. Lallemend.
- Curvelo-Garcia, A. S. (1988). *Controlo de Qualidade dos Vinhos. Química enológica. Métodos Analíticos*. IVV.
- CVR Dão. (2023a). *A Região Demarcada — 114 anos de História!* Obtido a 27 de janeiro de 2023, de <https://www.cvrdao.pt/pt/regiao-demarcada/>
- CVR Dão. (2023b). *Castas — Conheça as castas do Dão*. Obtido a 27 de janeiro de 2023, de <https://www.cvrdao.pt/pt/castas/>
- CVR Dão. (2023c). *Terroir — Vinhos com características únicas*. Obtido a 27 de janeiro de 2023, de <https://www.cvrdao.pt/pt/terroir/>
- Eaton, A. D., & American Public Health Association (Eds.). (2006). *Standard methods for the examination of water & wastewater* (21st ed. 2005, centennial ed., [Nachdr.]). American Public Health Association.
- Ezequiel, M. M. R. L. (2010). *Ensaio De Tratamentos Térmicos Em Vinhos Tintos—Efeitos na composição Físico-Química e análise sensorial* [Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa].
- Ferreira, I., Heleno, S. A., Paiva, F., & Bento, A. A. (2020). *Castanea Sativa Mill flowers: Its application as natural wine conservators in alternative to the addition of sulphites* (Instituto Nacional da Propriedade Industrial Patent N.º PT109448B).
- Flanzy, C. (1998). *Oenologie: Fondements scientifiques et technologiques*. Tec & doc-Lavoisier.
- Fleet, G. (2003). *Yeast interactions and wine flavour*. International Journal of Food Microbiology, 86(1–2), 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)

Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2010). *Wine microbiology: Practical applications and procedures* (2. ed). Springer.

Global Wines. (2023). *Bem vindo à Global Wines*. Obtido a 27 de janeiro de 2023, de globalwines.pt

Global Wines S.A. (2021a). *Manual da Qualidade e Ambiente* (Edição N).

Global Wines S.A. (2021b). *Manual de Segurança Alimentar* (Edição K).

Global Wines S.A. (2022). *Plano de Higienização* (Edição H).

Gomes, M. C. S. R. (2009). *Doenças e contaminações microbianas dos vinhos*. DRAPCentro. Obtido a 13 de março de 2023, de https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/doencas_dos_vinhos.pdf

Iland, P., Bruer, N., Ewart, A., Markides, A., & Sitters, J. (2004). *Monitoring the winemaking process from grapes to wine techniques and concepts*. Patrick Iland Wine Promotions.

IVV. (2021a). *Evolução da Produção por Região Vitivinícola—Série 2009/2010 a 2022/2023*. Instituto da Vinha e do Vinho. Obtido a 13 de abril de 2023, de <https://www.ivv.gov.pt/np4/36/>

IVV. (2021b). *Vinhos e Aguardentes de Portugal—Anuário 2020-2021* (p. 188). Instituto da Vinha e do Vinho.

Jackowetz, J. N., & Orduña, R. M. (2012). *Metabolism of SO₂ binding compounds by Oenococcus oeni during and after malolactic fermentation in white wine*. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.025>

Jackson, R. S. (2008). *Wine science: Principles and applications* (3. ed). Elsevier.

Jiménez-Martínez, M. D., Gil-Muñoz, R., Gómez-Plaza, E., & Bautista-Ortín, A. B. (2018). *Performance of purified grape pomace as a fining agent to reduce the levels of some contaminants from wine*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(6), 1061–1070. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1459050>

Johnson, H. (1989). *Vintage: The story of wine*. Simon and Schuster.

- Kunkee, R. E., & Bisson, L. F. (1993). *Wine-making Yeasts*. Em *The Yeasts* (pp. 69–127). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092543-1.50013-8>
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). *Yeast and its importance to wine aroma—A review*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 97–129. <https://doi.org/10.1080/00207230701791448>
- Lidon, F., & Silvestre, M. M. (2008). *Conservação de Alimentos—Princípios e Metodologias*. Escolar Editora.
- Liger-Belair, G., Polidori, G., & Zéninari, V. (2012). *Unraveling the evolving nature of gaseous and dissolved carbon dioxide in champagne wines: A state-of-the-art review, from the bottle to the tasting glass*. *Analytica Chimica Acta*, 732, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.10.007>
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). *Spoilage yeasts in the wine industry*. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 23–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0)
- Malfeito-Ferreira, M. (2011). *Yeasts and wine off-flavours: A technological perspective*. *Annals of Microbiology*, 61(1), 95–102. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0098-0>
- Malfeito-Ferreira, M. (2018). *Two Decades of “Horse Sweat” Taint and Brettanomyces Yeasts in Wine: Where do We Stand Now?*, *Beverages*, 4(2), 32. <https://doi.org/10.3390/beverages4020032>
- Malfeito-Ferreira, M. (2019). *Spoilage Yeasts in Red Wines*. Em *Red Wine Technology* (pp. 219–235). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00015-3>
- Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (1995). *Os problemas microbiológicos do engarrafamento de vinhos: Uma questão ainda em aberto*. *Actas do 3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*.
- Navarre, C. (1997). *Enologia: Técnicas de produção do vinho*. Europa-América.
- OIV. (2023). *State of the World Vine and Wine Sector in 2022*. Organização Internacional da Vinha e do Vinho. Obtido a 14 de abril de 2023, de

https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_State_of_the_world_Vine_and_Wine_sector_in_2022_2.pdf

Oliveira, M., Tiwari, B. K., & Duffy, G. (2020). *Emerging Technologies for Aerial Decontamination of Food Storage Environments to Eliminate Microbial Cross-Contamination*. *Foods*, 9(12), 1779. <https://doi.org/10.3390/foods9121779>

Perkins, W. D. (1986). *Topics in Chemical Instrumentation: Fourier Transform-Infrared Spectroscopy: Part I. Instrumentation* (Vol. 63). *Journal of Chemical Education*.

Proenol. (2019a). *Ficha Técnica 0493-05—Divosan Activ VT5*.

Proenol. (2019b). *Ficha Técnica 0497-05—TC 86 VS8*.

Proenol. (2019c). *Ficha Técnica 0521-05—Quattro Plus VC74*.

Proenol. (2020). *Ficha Técnica 0093-17—Leveduras Encapsuladas Proelif*.

Rayess, I., Albasi, C., Bacchin, P., Taillandier, P., Raynal, J., Mietton-Peuchot, P., & Devatine, A. (2011). *Crossflow microfiltration applied to oenology: A review*. *Journal of Membrane Science*, 382, 1–19.

Ribéreau-Gayon, J. (1989). *Tratado de enología: Ciencias y técnicas del vino* (1a ed). Hemisferio Sur.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2005). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications* (1.^a ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0470010363>

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine—Stabilization and Treatments* (2nd ed). John Wiley.

Rodrigues, N., Goncalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2001). *Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 588–599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01275.x>

- Romano, P. (2003). *Function of yeast species and strains in wine flavour*. International Journal of Food Microbiology, 86(1–2), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3)
- Rosa, H. (2008). *Higiene em enologia: Qual a importância da higiene na indústria enológica*. Ecolab Hispano-Portuguesa – F&B Division. Obtido a 3 de fevereiro de 2023, de https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/higiene_em_enologia.pdf
- Schifferdecker, A. J., Dashko, S., Ishchuk, O. P., & Piškur, J. (2014). *The wine and beer yeast Dekkera bruxellensis*. Yeast, 31(9), 323–332. <https://doi.org/10.1002/yea.3023>
- Silva, M., Nunes, C., Maricato, E., Cunha, A., & Barroso, S. (2013). *Process of production of wines without addition of sulfurous anhydride by using films based on quitosana* (Instituto Nacional da Propriedade Industrial Patent N.º PT105981A).
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., & Calderón, F. (2007). *The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera Brettanomyces and Dekkera: A review*. Food Chemistry, 102(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.030>
- Threlfall, R. T., & Morris, J. R. (2002). *Using dimethyldicarbonate to minimize sulfur dioxide for prevention of fermentation from excessive yeast contamination in juice and semi-sweet wine*. Journal of Food Science, 67 (7), 2758–2762.
- Tomera, J. F. (1999). *Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption*. Trends in Food Science & Technology, 10(4–5), 129–138. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00035-7)
- Tubia, I., Prasad, K., Pérez-Lorenzo, E., Abadín, C., Zumárraga, M., Oyanguren, I., Barbero, F., Paredes, J., & Arana, S. (2018). *Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of Brettanomyces*. International Journal of Food Microbiology, 283, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.020>
- Van Wyk, S., & Silva, F. V. M. (2019). *Nonthermal Preservation of Wine*. Em Preservatives and Preservation Approaches in Beverages (pp. 203–235). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816685-7.00007-0>

Wedral, D., Shewfelt, R., & Frank, J. (2010). *The challenge of Brettanomyces in wine*. LWT - Food Science and Technology, 43(10), 1474–1479.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010>

Zamora, F. (2009). *Biochemistry of Alcoholic Fermentation*. Em M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 3–26). Springer New York.

https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_1

ANEXO I

Tabela I – Detergentes e/ou desinfetantes mais aplicados no processo de higienização (adaptado de Global Wines S.A., 2022; Proenol, 2019a, 2019b, 2019c).



DESCRIÇÃO: Detergente desinfetante alcalino clorado, de espuma reduzida para utilização em aplicações CIP (*clean in place*) e lavagem por spray nas indústrias alimentares, de bebidas e de lacticínios.

VANTAGENS NA SUA UTILIZAÇÃO:

- i) Ação biocida de largo espectro;
- ii) Eficácia na remoção de material orgânico, incluindo sujidade alimentar, manchas e aromas estranhos;
- iii) Fácil enxaguamento, minimizando o consumo de água;
- iv) Custos reduzidos, na utilização de águas duras.

OPERAÇÃO: Descoloração alcalino-clorada

LOCAL/EQUIPAMENTOS: Interior de depósitos, filtro de terras e placas, condutas, mangueiras e bombas, sempre que se mude de vinhos tintos para vinhos brancos/rosés ou na presença de defeitos sensoriais (operações em adega)

CONCENTRAÇÃO: 2% à temperatura ambiente (ou 2% a 50°C)

CONTROLO: Ausência de resíduos cáusticos (indicador – fenoltaleína) e resíduos clorados (fita de cloro) na água de enxaguamento



DESCRIÇÃO: Detergente líquido, cáustico, com elevadas propriedades anti espuma, para sujidades difíceis. Garante excelentes resultados de limpeza, a custos reduzidos.

VANTAGENS NA SUA UTILIZAÇÃO:

- i) eficaz na remoção de uma vasta gama de sujidades orgânicas e na prevenção da formação de depósitos/incrustações;
- ii) usado numa vasta gama de aplicações incluindo CIP (*clean in place*)
- iii) produto resultante de uma mistura única que reduz a complexidade de aplicação.

OPERAÇÃO: Desincrustação

LOCAL/EQUIPAMENTOS: Interior de depósitos, condutas, mangueiras e bombas, antes de cada utilização (operações em adega), filtro de placas e enchedora (operações de engarrafamento)

CONCENTRAÇÃO: 2% à temperatura ambiente (ou 50°C no caso do pasteurizador)

CONTROLO: Ausência de resíduos cáusticos na água de enxaguamento (indicador – fenoltaleína)



DESCRIÇÃO: Desinfetante oxidante à base de ácido peracético, altamente eficaz, indicado para várias aplicações na indústria alimentar, bebidas e lacticínios

VANTAGENS NA SUA UTILIZAÇÃO:

- i) Muito eficaz contra todos os tipos de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos);
- ii) Fácil de enxaguar e sem corantes, garante segurança em todas as aplicações alimentares;
- iii) Baixo impacto ambiental;
- iv) Excelentes propriedades desodorizantes e de remoção de manchas.

OPERAÇÃO: Desinfecção ácida

LOCAL/EQUIPAMENTOS: Operações de Engarrafamento (enchedoras, pasteurizador e filtro de membranas) e Operações de Adega (interior dos depósitos, sempre que se passe de vinhos tintos para vinhos brancos/rosés ou se verifiquem defeitos sensoriais)

CONCENTRAÇÃO: 0,5% à temperatura ambiente (ou 1% na enchedora, depósitos e filtro de membranas)

CONTROLO: Ausência de resíduos ácidos na água de enxaguamento (fita de ácido peracético)

ANEXO II

Tabela II – Composição do meio de cultura Agar *Brettanomyces*, da empresa Condalab, utilizado na realização dos métodos de análise microbiológicos na empresa Global Wines S.A. (Condalab, 2022)

Agar <i>Brettanomyces</i> (composição em g/L) ¹	
Dextrose	10 g/L
Verde de bromocresol	0,022 g/L
Cicloheximida	0,01 g/L
Peptona	5 g/L
Extrato de levedura	3 g/L
Ácido cumárico	0,1 g/L
Agar bacteriológico	20 g/L
Cloranfenicol	0,1 g/L
Extrato de malte	3 g/L
Tiamina	0,02 g/L
Base nitrogenada de levedura	3 g/L

¹A dextrose é o hidrato de carbono fermentescível, proporcionando carbono e energia às leveduras. Peptona e extrato de malte providenciam azoto, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais para o crescimento das leveduras. Extrato de levedura serve de fonte de vitaminas, particularmente do grupo B. Tiamina é o fator de crescimento. São colocados agentes seletivos (antibióticos Cloranfenicol e cicloheximida) para permitir a recuperação exclusiva de *Brettanomyces*, inibindo o crescimento de contaminantes comuns em vinhos, como a *Saccharomyces cerevisiae* (Condalab, 2022).

PREPARAÇÃO DO MEIO:

Suspender 75 gramas de meio de cultura num litro de água desionizada. Misturar bem e promover a dissolução do meio na solução, com aquecimento da mistura e agitação frequente. Deixar ferver um minuto até à dissolução completa. Distribuir o meio de cultura ainda quente em frascos *schott*. Posteriormente, deixar arrefecer o meio esterilizado à temperatura ambiente dentro da câmara de fluxo laminar e armazenar os frascos com o meio de cultura no frigorífico durante o tempo máximo de um mês.

Quando necessário, fundir os meios de cultura e distribuir pelas placas de petri esterilizadas, deixando solidificar o mesmo antes da sua utilização. Após solidificado, proceder à inoculação dos filtros de membrana.

ANEXO III

Tabela III – Composição do meio de cultura Agar Nutriente WL, da empresa Condalab, utilizado na realização dos métodos de análise microbiológicos na empresa Global Wines S.A. (Condalab, 2019)

Agar Nutriente WL (composição em g/L)²	
Agar bacteriológico	15 g/L
Cloreto de cálcio	0,125 g/L
Cloreto de ferro (III)	0,0025 g/L
Sulfato de manganês (II)	0,0025 g/L
Cloreto de potássio	0,425 g/L
Extrato de levedura	4 g/L
Verde de bromocresol	0,022 g/L
Dextrose	50 g/L
Sulfato de magnésio	0,125 g/L
Fosfato monopotássico	0,55 g/L
Triptona	5 g/L

²A triptona fornece azoto, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais para o crescimento das leveduras. A dextrose é o hidrato de carbono fermentescível, proporcionando carbono e energia. Extrato de levedura serve de fonte de vitaminas, particularmente do grupo B. Fosfato monopotássico é o tampão. Os cloretos de cálcio, ferro e potássio fornecem iões essenciais para o equilíbrio osmótico. Os sulfatos de manganês e magnésio são fontes de catiões divalentes. Verde de bromocresol é o indicador de pH. O agar bacteriológico é o agente solidificante do meio (Condalab, 2019)

PREPARAÇÃO DO MEIO:

Suspender 75 gramas de meio de cultura num litro de água desionizada. Misturar bem e promover a dissolução do meio na solução, com aquecimento da mistura e agitação frequente. Deixar ferver um minuto até à dissolução completa. Esterilizar no autoclave a 121°C durante 15 minutos, em frascos de *schott*. Posteriormente, deixar arrefecer o meio esterilizado à temperatura ambiente dentro da câmara de fluxo laminar e armazenar os frascos com o meio de cultura no frigorífico durante o tempo máximo de um mês.

Quando necessário, fundir os meios de cultura e distribuir pelas placas de petri esterilizadas, deixando solidificar o mesmo antes da sua utilização. Após solidificado, proceder à inoculação dos filtros de membrana.

ANEXO IV

Procedimento

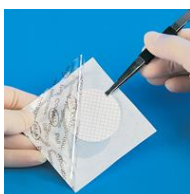
Método de filtração por membrana para pesquisa de microrganismos viáveis

(adaptado de método interno em vigor na empresa Global Wines S.A.)

1) Materiais



Placas de Petri de contendo meio de cultura apropriado



Filtros de Membrana brancos, quadriculados e estéreis, de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade



Copos de filtração graduados e estéreis, com 47 mm de diâmetro



Pinça em aço inox, com as extremidades arredondadas

- Caneta acetato;

- Saca-rolhas

2) Equipamentos

Sistema de filtração:



Kitasato de 1L



Rampa de filtração individual



Suporte porta-filtro, para membranas de 47 mm de diâmetro



Bomba de vácuo (mínimo a 0,5 atm);



Bico de Bunsen



Câmara de Fluxo Laminar



Estufa de incubação (com regulação de temperatura pretendida)

3) Técnica – Método de Filtração por Membrana

1. Ligar as mangueiras do sistema de filtração ao kitasato para filtração a vácuo;
2. Proceder à desinfecção da bancada da câmara de fluxo laminar com etanol a 70%;
3. Colocar sobre a bancada de trabalho os materiais necessários: Placas de Petri contendo meio de cultura apropriado. copos de filtração estéreis, pinça com as extremidades

mergulhadas em etanol a 70%, filtros de membrana brancos, quadriculados e estéreis, caneta acetato e saca-rolhas.

4. Ligar a câmara de fluxo laminar (FAN) e a lâmpada UV;
5. Após 10 minutos, desligar a lâmpada UV e ligar a lâmpada de iluminação;
6. Desinfetar o sistema de filtração com etanol a 70% e passar água esterilizada;
7. Com a pinça retirar o filtro em aço inox do porta-filtro, mergulhá-lo na solução de etanol a 70% e passá-lo à chama. Quando esta se extinguir voltar a colocá-lo corretamente no suporte;
8. Identificar as placas de Petri com o lote/depósito do produto e data de análise;
9. Abrir a torneira do gás e ligar o bico de Bunsen, tendo em conta que a chama tem de estar azulada;
10. Em condições de assepsia, colocar no porta-filtro a membrana devidamente centrada com a face quadriculada voltada para cima;
11. Encaixar o copo de filtração no porta-filtro, sem danificar a membrana;
12. Em condições de assepsia, verter cuidadosamente o volume de 100 mL de amostra de vinho no copo de filtração;
13. Ligar a bomba de vácuo e proceder à filtração da amostra;
14. Retirar o copo de filtração do porta-filtro e, em condições de assepsia, retirar a membrana com a pinça, previamente esterilizada à chama.
15. Colocar cuidadosamente a membrana, com a superfície quadriculada voltada para cima, na placa de Petri, identificada previamente e contendo o meio de cultura correspondente;
16. Pressionar suavemente a membrana com a pinça sobre o meio de cultura de forma que esta fique completamente em contacto com o meio;
17. Proceder de igual forma nas restantes amostras (a partir do ponto 10.)
18. Colocar as placas de Petri com as membranas na estufa, em posição invertida, procedendo à sua incubação à temperatura e tempo necessário para o crescimento de colónias viáveis;
19. Após o período de incubação, detetar a presença de colónias, proceder à sua contagem e respetivo registo.

ANEXO V

Amostragem 7a) - Análise microbiológica de controlo de engarrafamento de vinhos

Tabela V — Contagem de microrganismos (UFC/100 ml) nas placas inoculadas com as amostras em estudo, recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana.

Data Análise	Tipo de Vinho	Antes da estabilização microbiológica		Após a estabilização microbiológica	
		Data Recolha Amostra	UFC/ 100 ml	Data Engarrafamento	UFC/ 100 ml
18.01.2023	Vinho Branco	16.01.2023	Incontável	17.01.2023	0
18.01.2023	Vinho Tinto	16.01.2023	Incontável	18.01.2023	0
20.01.2023	Vinho Tinto	16.01.2023	Incontável	18.01.2023	0
25.01.2023	Vinho Branco	24.01.2023	18 leveduras	24.01.2023	0
25.01.2023	Vinho Branco	25.01.2023	26 leveduras	25.01.2023	3 leveduras
26.01.2023	Vinho Tinto	26.01.2023	Incontável	26.01.2023	0
30.01.2023	Vinho Branco	30.01.2023	Incontável	30.01.2023	0
01.02.2023	Vinho Branco	31.01.2023	6 leveduras	31.01.2023	0
01.02.2023	Vinho Rosé	01.02.2023	0	01.02.2023	0
14.03.2023	Vinho Tinto	14.03.2023	Incontável	14.03.2023	0
22.03.2023	Vinho Branco	20.03.2023	Incontável	20.03.2023	7 leveduras
22.03.2023	Vinho Rosé	20.03.2023	12 leveduras	20.03.2023	10 leveduras
22.03.2023	Vinho Tinto	22.03.2023	10 leveduras	21.03.2023	0
22.03.2023	Vinho Tinto	22.03.2023	Incontável	22.03.2023	0
23.03.2023	Vinho Tinto	23.03.2023	Incontável	23.03.2023	0
30.03.2023	Vinho Tinto	30.03.2023	Incontável	30.03.2023	0
11.04.2023	Vinho Tinto	06.04.2023	1 levedura	06.04.2023	0
11.04.2023	Vinho Tinto	11.04.2023	Incontável	11.04.2023	0
26.04.2023	Vinho Tinto	26.04.2023	Incontável	26.04.2023	0
27.04.2023	Vinho Tinto	27.04.2023	Incontável	27.04.2023	0
27.04.2023	Vinho Tinto	27.04.2023	<50 leveduras	27.04.2023	0
03.05.2023	Vinho Tinto	28.04.2023	21 leveduras	28.04.2023	7 leveduras
09.05.2023	Vinho Tinto	09.05.2023	Incontável	09.05.2023	0
09.05.2023	Vinho Branco	09.05.2023	Incontável	09.05.2023	0
02.06.2023	Vinho Branco	01.06.2023	36 leveduras	01.06.2023	0
02.06.2023	Vinho Branco	01.06.2023	<50 leveduras	02.06.2023	14 leveduras

ANEXO VI

Amostragem 7b) - Análise microbiológica na etapa de tiragem na produção de vinhos espumantes

Tabela VI-1 — Resultados dos testes de zaragatoa UltraSnap realizados no arranque da linha de tiragem, através da leitura da luz emitida (em RLU) recorrendo a um luminómetro.

Data	Bico da enchedora			Interior da enchedora		
	0-20 RLU	21-59 RLU	> 60 RLU	0-20 RLU	21-59 RLU	> 60 RLU
03.02.2023	x			x		
06.02.2023	x			x		
07.02.2023	x			x		
08.02.2023	x			x		
09.02.2023	x			x		
10.02.2023	x			x		
13.02.2023	x			x		
14.02.2023	x			x		
15.02.2023	x			x		
16.02.2023	x			x		
17.02.2023 ¹	x (3º)	x (2º)	x (1º)	x		
22.02.2023	x			x		
23.02.2023	x			x		
24.02.2023	x			x		
28.02.2023	x			x		
01.03.2023	x			x		
02.03.2023	x			x		
03.03.2023	x			x		
06.03.2023	x			x		
07.03.2023 ²	x			x (3º)	x (2º)	x (1º)
08.03.2023	x			x		
09.03.2023	x			x		

¹1ºTeste ATP no Bico deu REPROVADO, posteriormente nova passagem de água para higienizar, novo teste a dar ATENÇÃO, seguido de uma 2º passagem de água de enxaguamento. Teste POSITIVO após 2 passagens com água.

²1ºTeste ATP no interior da enchedora deu REPROVADO, posteriormente nova passagem de água para higienizar, novo teste a dar ATENÇÃO, seguido de uma 2º passagem de água de enxaguamento. Teste POSITIVO após 2 passagens com água.

Tabela VI-B – Contagem de microrganismos (UFC/100 ml) nas placas de exposição no âmbito do estudo ao ambiente/ar da enchedora na etapa de tiragem da produção de vinhos espumantes na Global Wines S.A.

Data	Placa de exposição 1	Placa de exposição 2 (duplicado)
	UFC/ 100 ml	UFC/ 100 ml
03.02.2023	1 fungo	1 levedura
06.02.2023	0	0
07.02.2023	0	0
08.02.2023	0	0
09.02.2023	0	0
13.02.2023	0	0
14.02.2023	0	1 fungo
15.02.2023	0	0
16.02.2023	0	0
17.02.2023	0	0
22.02.2023	2 leveduras	2 leveduras
23.02.2023	0	0
24.02.2023	0	0
28.02.2023	0	0
01.03.2023	0	0
03.03.2023	0	0
06.03.2023	0	0
07.03.2023	0	0

Tabela VI-C – Contagem de microrganismos (UFC/100 ml) nas placas inoculadas com as amostras recolhidas para controlo microbiológico da etapa de tiragem, recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana.

Legenda: AFM – antes do filtro de membranas; SFM – saída do filtro de membranas; GE – garrafa enxaguada; VSL – vinho base sem leveduras; VCL – vinho base com leveduras.

	AFM	SFM	GE ¹	VSL	VCL ARRANQUE	VCL 2H	VCL 4H	VCL 6H
Data Análise	Contagem em UFC/100ml							
03.02.2023	26	0	0	0	0	0	0	-
06.02.2023	2	0	0	0	0	0	0	-
07.02.2023	18	0	0	0	0	0	0	-
08.02.2023	0	0	0	0	0	0	0	-
09.02.2023	0	0	0	0	0	0	0	-
10.02.2023	6	0	0	0	0	0	0	0
13.02.2023	6	0	0	0	0	0	0	0
14.02.2023	32	0	0	0	0	0	0	-
15.02.2023	19	0	0	0	0	0	0	-
16.02.2023	5	0	0	0	0	0	0	0
17.02.2023	1	0	0	0	0	0	0	-
22.02.2023	51	0	0	0	0	0	0	-
23.02.2023	0	0	0	0	0	0	0	-
24.02.2023	9	0	0	0	0	0	0	-
28.02.2023	8	0	0	0	0	0	0	-
01.03.2023	21	0	0	0	0	0	-	-
02.03.2023	0	0	0	0	0	0	0	-
03.03.2023	20	0	0	0	0	0	0	-
06.03.2023	INCONTÁVEL	0	0	0	0	0	0	-
07.03.2023	2	0	0	0	0	0	0	-
08.03.2023	16	0	0	0	0	0	0	-
09.03.2023	17	0	0	0	0	0	-	-

¹filtração em membrana de 100ml de água autoclavada, colocada *a priori* no interior da garrafa vazia enxaguada, em condições de assepsia.

ANEXO VII

Amostragem 7c) - Controlo microbiológico do processo de higienização

Tabela VII-A - Contagem de microrganismos (UFC/100 ml) nas placas inoculadas com as amostras recolhidas para controlo microbiológico da higienização, recorrendo ao método de análise microbiológica de filtração em membrana.

Data Amostragem	Depósito nº	Agente Químico Higienização	Local Recolha Amostra	Contagem de leveduras e bolores
				UFC/100 ml
23.01.2023	104	-	Escala	11 bolores/4 leveduras
			Escala DUPLICADO	7 bolores/28 leveduras
			Provadeira	2 leveduras
			Provadeira DUPLICADO	Incontável
			Interior do Depósito	1 levedura
			Interior DUPLICADO	1 levedura
			Torneira da Mangueira	0
			Torneira DUPLICADO	0
25.01.2023	5	-	Escala	9 leveduras
			Escala DUPLICADO	10 leveduras
			Provadeira	Incontável
			Provadeira DUPLICADO	Incontável
			Interior do Depósito	5 leveduras
			Interior DUPLICADO	10 leveduras
			Torneira da Mangueira	3 leveduras
			Torneira DUPLICADO	34 leveduras
26.01.2023	143	-	Escala	0
			Escala DUPLICADO	0
			Provadeira	0
			Provadeira DUPLICADO	0
			Interior do Depósito	0
			Interior DUPLICADO	0
			Torneira da Mangueira	0
			Torneira DUPLICADO	0
30.01.2023	163	-	Escala	0
			Escala DUPLICADO	0
			Provadeira	Incontável
			Provadeira DUPLICADO	Incontável
			Interior do Depósito	0
			Interior DUPLICADO	0
			Torneira da Mangueira	0
			Torneira DUPLICADO	0

Data Amostragem	Depósito nº	Agente Químico Higienização	Local Recolha Amostra	Contagem de leveduras e bolores
				UFC/100 ml
13.02.2023	104	-	Escala	Incontável
			Escala DUPLICADO	Incontável
			Provadeira	Incontável
			Provadeira DUPLICADO	Incontável
			Interior do Depósito	Incontável
			Interior DUPLICADO	Incontável
			Torneira da Mangueira	8 leveduras
			Torneira DUPLICADO	7 leveduras
15.02.2023	39	Quatro Plus (Detergente cáustico) + Divosan Activ (Desinfetante à base de ácido peracético)	Escala	Incontável
			Escala DUPLICADO	Incontável
			Provadeira	0
			Provadeira DUPLICADO	0
			Interior do Depósito	0
			Interior DUPLICADO	0
			Torneira da Mangueira	Incontável
			Torneira DUPLICADO	Incontável
02.03.2023	142	Divosan TC 86 (detergente desinfetante alcalino)	Escala	Incontável
			Escala DUPLICADO	1 Fungo
			Provadeira	Incontável
			Provadeira DUPLICADO	Incontável
			Interior do Depósito	Incontável
			Interior DUPLICADO	Incontável
			Torneira da Mangueira	Incontável
			Torneira DUPLICADO	Incontável
03.03.2023	8	Divosan TC 86 (detergente desinfetante alcalino)	Escala	Incontável
			Escala DUPLICADO	0
			Provadeira	0
			Provadeira DUPLICADO	0
			Interior do Depósito	0
			Interior DUPLICADO	1 levedura
			Torneira da Mangueira	0
			Torneira DUPLICADO	0
07.03.2023	159	Divosan TC 86 (detergente desinfetante alcalino)	Escala	0
			Escala DUPLICADO	0
			Provadeira	5 leveduras
			Provadeira DUPLICADO	0
			Interior do Depósito	1 levedura
			Interior DUPLICADO	0
			Torneira da Mangueira	0
			Torneira DUPLICADO	0

Data Amostragem	Depósito nº	Agente Químico Higienização	Local Recolha Amostra	Contagem de leveduras e bolores
				UFC/100 ml
07.03.2023	160	Divosan TC 86 (detergente desinfetante alcalino)	Escala	Incontável
			Escala DUPLICADO	Incontável
			Provadeira	0
			Provadeira DUPLICADO	0
			Interior do Depósito	0
			Interior DUPLICADO	0
			Torneira da Mangueira	0
			Torneira DUPLICADO	0
08.03.2023	136	Divosan TC 86 (detergente desinfetante alcalino)	Escala	Incontável
			Escala DUPLICADO	Incontável
			Provadeira	Incontável
			Provadeira DUPLICADO	Incontável
			Interior do Depósito	0
			Interior DUPLICADO	0
			Torneira da Mangueira	0
			Torneira DUPLICADO	0
08.03.2023	158	Divosan TC 86 (detergente desinfetante alcalino)	Escala	Incontável
			Provadeira	Incontável
			Provadeira DUPLICADO	Incontável
			Interior do Depósito	0
			Interior DUPLICADO	0
			Torneira da Mangueira	0
			Torneira DUPLICADO	0
09.03.2023	155	Divosan TC 86 (detergente desinfetante alcalino) + Passagem de Escovilhão (na provadeira e escala)	Escala	0
			Escala DUPLICADO	0
			Provadeira	3 leveduras
			Provadeira DUPLICADO	6 leveduras
			Interior do Depósito	0
			Interior DUPLICADO	0
			Torneira da Mangueira	0
			Torneira DUPLICADO	0
09.03.2023	35	Divosan TC 86 (detergente desinfetante alcalino)	Escala	0
			Escala DUPLICADO	0
			Provadeira	0
			Provadeira DUPLICADO	0
			Interior do Depósito	0
			Interior DUPLICADO	0
			Torneira da Mangueira	0
			Torneira DUPLICADO	0

Data Amostragem	Depósito nº	Agente Químico Higienização	Local Recolha Amostra	Contagem de leveduras e bolores
				UFC/100 ml
10.03.2023	65	Divosan TC 86 (detergente desinfetante alcalino)	Escala	Incontável
			Escala DUPLICADO	20 Leveduras/ 2 Fungo
			Provadeira	0
			Provadeira DUPLICADO	1 Fungo
			Interior do Depósito	0
			Interior DUPLICADO	0
			Torneira da Mangueira	9 Leveduras/1 Fungo
			Torneira DUPLICADO	0

Tabela VII-B - Resultados dos testes de zaragatoa UltraSnap realizados no âmbito do controlo microbiológico do processo de higienização em adega, através da leitura da luz emitida (em RLU) recorrendo a um luminómetro.

Nota: 0-20 RLU – Aprovado; 21-60 RLU – Atenção; >60 RLU – Reprovado

Data Amostragem	Depósito nº	Agente Químico Higienização	Local Recolha Amostra	Leitura de luz emitida
				RLU
21.03.2023	8	Quatro Plus + Divosan TC 86 + Escovilhão na Provadeira + Escala somente TC 86	Escala	80
			Provadeira	7
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	0
21.03.2023	5	Quatro Plus + Divosan TC 86 + Escovilhão na Provadeira + Escala somente TC 86	Escala	76
			Provadeira	10
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	0
22.03.2023	7	Quatro Plus + Divosan TC 86 + Divosan Activ (todo o depósito) + Escovilhão na Provadeira	Escala	8
			Provadeira	16
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	90
22.03.2023	19	Divosan TC 86 + Escovilhão na Provadeira	Escala	32
			Provadeira	29
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	5
22.03.2023	20	Divosan TC 86 + Escovilhão na Provadeira	Escala	22
			Provadeira	0
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	0
23.03.2023	104	Divosan TC 86 + Divosan Activ (todo o depósito) + Desmontagem da Provadeira e Escala	Escala	0
			Provadeira	0
			Interior do Depósito	6
			Torneira da Mangueira	0

Data Amostragem	Depósito nº	Agente Químico Higienização	Local Recolha Amostra	Leitura de luz emitida
				RLU
28.03.2023	138	Quatro Plus + Divosan Activ + Escovilhão na Provadeira	Escala	44
			Provadeira	0
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	0
29.03.2023	115	Divosan TC-86 + Escovilhão na Provadeira	Escala	190
			Provadeira	9
			Interior do Depósito	7
			Torneira da Mangueira	36
29.03.2023	113	Quatro Plus + Divosan Activ + Escovilhão na Provadeira	Escala	70
			Provadeira	3
			Interior do Depósito	9
			Torneira da Mangueira	0
06.04.2023	3	Divosan TC-86	Escala	7
			Provadeira	29
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	26
06.04.2023	55	Quatro Plus + Divosan TC-86	Escala	53
			Provadeira	0
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	15
06.04.2023	56	Divosan TC-86	Escala	66
			Provadeira	14
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	0
06.04.2023	2	Divosan TC-86	Escala	144
			Provadeira	20
			Interior do Depósito	3
			Torneira da Mangueira	0
10.04.2023	157	Divosan Activ	Escala	0
			Provadeira	5
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	0
14.04.2023	18	Quatro Plus + Divosan Activ	Escala	18
			Provadeira	0
			Interior do Depósito	2
			Torneira da Mangueira	0
19.04.2023	28	Divosan Activ	Escala	17
			Provadeira	2
			Interior do Depósito	0
			Torneira da Mangueira	18

Tabela VII-C - Resultados do controlo microbiológico do processo de higienização do filtro de terras, localizado na zona da adega.

Data Amostragem	Agente Químico Higienização	Local Recolha Amostra	Contagem de leveduras e bolores
			UFC/100 ml
01.02.2023	Divosan TC-86	Entrada do Vinho	Incontável
		Entrada do Vinho DUPLICADO	Incontável
		Saída do Vinho	0
		Saída do Vinho DUPLICADO	0
		Interior do Filtro	0
		Interior do Filtro DUPLICADO	0
		Saída de Terras	0
		Saída de Terras DUPLICADO	0
24.02.2023	Divosan TC-86	Entrada do Vinho	3 leveduras
		Entrada do Vinho DUPLICADO	4 leveduras
		Saída do Vinho	Incontável
		Saída do Vinho DUPLICADO	Incontável
		Interior do Filtro	0
		Interior do Filtro DUPLICADO	0
		Saída de Terras	0
		Saída de Terras DUPLICADO	0
27.02.2023	Divosan TC-86	Entrada do Vinho	4 leveduras
		Entrada do Vinho DUPLICADO	1 levedura
		Saída do Vinho	Incontável
		Saída do Vinho DUPLICADO	Incontável
		Interior do Filtro	7 leveduras
		Interior do Filtro DUPLICADO	16 leveduras
		Saída de Terras	0
		Saída de Terras DUPLICADO	0
07.03.2023	Divosan Activ	Entrada do Vinho	0
		Entrada do Vinho DUPLICADO	0
		Saída do Vinho	0
		Saída do Vinho DUPLICADO	0
		Interior do Filtro	0
		Interior do Filtro DUPLICADO	0
		Saída de Terras	0
		Saída de Terras DUPLICADO	0

Data Amostragem	Agente Químico Higienização	Local Recolha Amostra	Contagem de leveduras e bolores
			UFC/100 ml
20.03.2023	Divosan Activ	Entrada do Vinho	0
		Entrada do Vinho DUPLICADO	0
		Saída do Vinho	0
		Saída do Vinho DUPLICADO	0
		Interior do Filtro	0
		Interior do Filtro DUPLICADO	0
		Saída de Terras	0
		Saída de Terras DUPLICADO	0
Data Amostragem	Agente Químico Higienização	Local Recolha Amostra	Leitura da luz emitida
27.03.2023	Divosan Activ	Entrada do Vinho	0
		Saída do Vinho	0
		Interior do Filtro	0
		Saída de Terras	0