

*Aos meus pais por me apoiarem e possibilitarem
mais uma vez de atingir o meu objectivo, e pelo
apoio que me têm dado ao longo deste período.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Quinta do Monte D'Oiro, por me ter concedido esta excelente oportunidade de realizar o estágio na empresa, pelo apoio e toda a colaboração na execução de todo este trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Doutora Marília Henriques, pela sua disponibilidade e orientação de todo o trabalho assim como na realização das minhas análises.

Agradeço à minha co-orientadora Mestre Graça Gonçalves, por toda a sua disponibilidade na elaboração e delineação do estágio, pela dedicação e pelo grande apoio que me deu na execução das minhas tarefas.

Agradeço à Doutora Ana Neves, o seu empenhamento desde o início em desenvolver todos os contactos necessários para que a execução deste estágio.

Agradeço à Técnica de Laboratório Luzia pela ajuda na realização das minhas análises.

Agradeço aos meus pais por todo o apoio que me deram em mais uma fase da minha vida, que decorreu em momentos bastante difíceis.

A todos os meus colegas que me acompanharam no desenrolar de todo este percurso, uma agradecimento especial.

Agradeço a todas as pessoas que ao longo da realização do estágio se empenharam e o tornaram possível, assim como agradeço a todas a sua dedicação, apoio e compreensão.

RESUMO

Durante a maturação das uvas, a sua película fica exposta a variadíssimas condições climatéricas. Na vinificação todo o processo exige um apertado controlo, para que não ocorram problemas desagradáveis na qualidade final do produto. Muitas destas situações poderão ser desencadeadas por fungos, bactérias e leveduras. A acção descontrolada destes microrganismos pode comprometer a qualidade do produto final e ter impactos económicos fortes para as empresas, quando estes problemas são percebidos pelos consumidores. Os vinhos envolvidos neste estudo são tintos da casta syrah da colheita de 2008, e sofreram diferentes formas de estágio. Os vários ensaios revelaram que entre os vinhos estudados, o que apresenta uma maior estabilidade microbiológica é o vinho que permaneceu em cuba de inox durante o desenrolar dos ensaios. Em relação aos vinhos, cujo estágio decorreu em barricas novas, não houve uma notória diferença de resultados em relação aos vinhos que se encontravam a estagiar em barricas usadas.

Palavras-chave: vinho, leveduras; alteração, estágio, barricas.

ABSTRACT

During the ripening of the grapes, your film is exposed to weather a variety of conditions. In the entire winemaking process requires a tight control, to prevent any nasty problems in the final product quality. Many of these situations can be triggered by fungi, bacteria and yeast. The uncontrolled action of microorganisms can compromise the quality of the final product and have strong economic impacts to businesses, as these issues are perceived by consumers. The wines are reds involved in the study of the syrah grape harvest of 2008, and suffered various forms of training. Various tests revealed that among the studied wines, which presents a greater microbiological stability is the wine that remained in stainless steel vats during the course of the tests. For wines, whose stage took place in new barrels, there was a noticeable difference in results for wines that were used in barrel aging.

Keywords: wine yeast; change, stage, drums.

ÍNDICE GERAL

CAPITULO I – INTRODUÇÃO	2
1.1 - INTRODUÇÃO	3
1.2 - OBJECTIVO	7
CAPITULO II – PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. BREVE REFERÊNCIA À REGIÃO VITIVINÍCOLA	9
2.1.1. A SUA APTIDÃO VITIVINÍCOLA	9
2.1.2. A SUA DIVERSIDADE	11
2.1.3. AS SUAS DENOMINAÇÕES	11
2.2. A CASTA SYRAH	12
2.2.1. ORIGEM DA CASTA SYRAH	12
2.2.2. CARACTERÍSTICAS DA CASTA SYRAH	13
2.3. MICRORGANISMOS DE ALTERAÇÃO	16
2.3.1. FUNGOS FILAMENTOSOS	16
2.3.2. BACTÉRIAS	18
2.3.2.1 BACTÉRIAS LÁCTICAS	18
2.3.2.2 BACTÉRIAS ACÉTICAS	24
2.3.3. LEVEDURAS DE ALTERAÇÃO	25
2.3.3.1. <i>DEKKERA/BRETTANOMYCES</i>	33
2.3.3.2. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	38
2.4. COMPOSTOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS	42
2.4.1. ÁCIDO ACÉTICO	43
2.4.2. FENÓIS VOLATEIS	44

2.5. BARRICAS DE MADEIRA	46
2.5.1. BREVE ABORDAGEM HISTÓRICA	46
2.5.2. BENEFÍCIOS E TIPOS DE MADEIRA	46
2.5.3. MADEIRA DE CARVALHO NOVO VERSUS CARVALHO USADO	47
2.6. O VINHO	48
2.6.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	48
CAPITULO III – VINIFICAÇÃO E ESTÁGIO DOS VINHOS	51
3.1. BREVE CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA	52
3.2. DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO E ESTÁGIO DOS VINHOS	53
CAPITULO IV – MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1.1. MATERIAL	55
4.1.1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	55
4.1.2. MEIOS DE CULTURA	56
4.1.2.1 – MEIO CRB - ROSE BENGAL CHLORANPHENICOL AGAR	56
4.1.2.2 – MEIO WLN - WALLERSTEIN LABORATORY NUTRIENT	57
4.1.2.3 – MEIO WLD - WALLERSTEIN LABORATORY DIFFERENTIAL	58
4.1.2.4 – MEIO DBDM - DEKKERA BRETTANOMYCES DIFFERENTIAL MEDIUM	58
4.1.2.5 – MEIO DE ETANOL (TESTE DE CONFIRMAÇÃO)	59
4.1.3. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	59
4.1.3.1 – FILTRAÇÃO POR MEMBRANA	59
4.1.3.2 – ESPALHAMENTO À SUPERFÍCIE	60
4.1.3.2. COLHEITA DAS AMOSTRAS	60

4.1.4. MÉTODOS	65
4.1.4.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	65
4.1.4.2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	65
4.1.4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	66
CAPITULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	68
CAPITULO VI – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	97
6.1. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	98
BIBLIOGRAFIA	99
MEDIAGRAFIA	100

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1- Limites de percepção (l), de recuperação (lr) e de preferência (lp) dos vários fenóis voláteis nos vinhos	45
Quadro 2- Ingredientes do meio CRB-Rose Bengal Chloranphenicol Agar em g/l	56
Quadro 3- Ingredientes do meio WLN-Wallerstein Laboratory Nutrient em g/l	57
Quadro 4- Meio de etanol (teste de confirmação)	59
Quadro 5- Cronograma de colheita de amostras	61
Quadro 6- Modo de amostragem	64
Quadro 7- Resultados do ensaio 1	68
Quadro 8- Resultados do ensaio 2	70
Quadro 9- Resultados do ensaio 3	72
Quadro 10- Resultados do ensaio 4	76
Quadro 11- Resultados do ensaio 5	79
Quadro 12- Confirmação de resultados do ensaio 5	81
Quadro 13- Resultados do ensaio 6	83
Quadro 14- Resultados do ensaio 7	87
Quadro 15- Resultados dos ensaios efectuados no ISA para a amostra AI	90
Quadro 16- Resultados dos ensaios efectuados no ISA para a amostra AII	92
Quadro 17- Resultados dos ensaios efectuados no ISA para a amostra B	94
Quadro 18- Resultados dos ensaios efectuados no ISA para a amostra C	96

CAPITULO I – INTRODUÇÃO

1.1 - INTRODUÇÃO

Durante a maturação das uvas, vários fenómenos decorrem simultaneamente, dando características únicas e típicas de cada casta. Destes fenómenos destacam-se: a acumulação de açúcares, a diminuição do teor de ácidos, a migração das matérias minerais, a modificação das paredes celulares, a evolução das substâncias azotadas, a evolução dos compostos fenólicos, a evolução das substâncias aromáticas e, tendo em conta que a película se encontra exposta às condições climáticas, a evolução da sua flora microbiana é notória (www.winexperts.terra.com.br).

Durante o processo de vinificação decorrem muitas alterações microbiológicas que são fundamentais para a boa qualidade dos vinhos, no entanto, quando não controladas devidamente poderão resultar em situações desagradáveis desprestigiando o produto final. Muitas destas situações poderão ser desencadeadas por fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Os fungos apresentam-se de diversos géneros, sendo estes frequentemente encontrados nas uvas, dos quais se destacam: *Aspergillus*, *Botrytis* e *Penicillium*, e, em menor quantidade, *Phytophthora*, *Moniliella* e *Cladosporium*. A proliferação descontrolada destes microrganismos nas uvas, antes da altura da vindima, desencadeia podridões, que tendo em conta a sua incidência poderá conduzir a uma alteração do processo de vinificação, e a uma alteração da qualidade do produto final. O impacto dos seus efeitos, não se limita à sua acção nas uvas, os fungos são capazes de se desenvolver sobre as superfícies externas e internas de madeira, recipientes de armazenamento e na cortiça das rolhas dos vinhos engarrafados, onde a sua infiltração pode ocorrer. Além de problemas estéticos resultantes do crescimento sobre estas superfícies, os fungos produzem metabolitos sensorialmente poderosos que são perceptíveis em partes-por-bilião ou partes-por-trilião de operações de concentração (www.winexperts.terra.com.br).

As bactérias podem apresentar-se em diferentes géneros, destacando-se as acéticas e as lácticas. As bactérias acéticas são divididas em quatro géneros: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconobacter*, e *Gluconoacetobacter*. e *Gluconoacetobacter hansenii*, que poderão ser encontradas em ambientes ricos em açúcar, onde o álcool está ausente ou presente em baixas concentrações, sendo estas condições típicas para que ocorra alteração dos produtos.

As bactérias lácticas na fermentação maloláctica são responsáveis pela redução da acidez total, muitas vezes elevada em vinhos tintos jovens, ao mesmo tempo que proporciona maior estabilidade biológica e complexidade de aroma e sabor. Esta técnica enológica é de suma importância proporcionando vinhos equilibrados e fáceis de beber, que actualmente são bastante apreciados pelos consumidores, nomeadamente os novos consumidores, os quais não têm intrínseco o conhecimento de beber vinho e procuram um produto social e fácil de beber (Fugelsang *et al.*, 2007).

As leveduras representam o grupo mais importante de microrganismos para os enólogos, uma vez que sem *Saccharomyces cerevisiae* não é possível produzir vinhos de qualidade. No entanto, para além de leveduras que proporcionam fermentações regulares com bons resultados finais, existem muitas outras espécies presentes durante a fermentação alcoólica, que produzem um forte impacto na sua qualidade, tanto pela positiva como pela negativa. *Kloeckera apiculata* é muitas vezes referida como uma "levedura apiculada" devido à sua morfologia em forma de limão. Esta levedura, bem como outras presentes em mostos, como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*,

Pichia Metschnikowia, e *Rhodotorula*, são também designadas de "leveduras nativas", "indígenas" ou "selvagens" porque elas têm origem na vinha ou na adega. Estas leveduras indígenas, muitas das vezes entram em competição com as leveduras que enologicamente são inoculadas com a finalidade de regular a fermentação, não sendo assim obtidos os resultados de fermentação expectáveis, traduzidos no produto final (Fugelsang *et al.*, 2007).

Durante o envelhecimento dos vinhos, algumas leveduras (*Candida*, *Hansenula* e *Pichia*) podem desenvolver-se devido à presença de oxigénio. Estas formam um filme sobre a superfície do vinho, o qual usualmente é associado a uma deterioração, sendo denominadas de "Leveduras de Véu". As formas perfeitas ou teleomórfas de espécies de *Cândida*, são representadas por um número de géneros diferentes, incluindo *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, e *Zygosaccharomyces*. *Saccharomycodes* é um género representado por uma única espécie *Saccharomycodes ludwigii*, que produz ascósporos de formato esférico, com uma pequena

borda. O crescimento é visível na presença de 1 mg/L de cicloheximida, no entanto, é inibida por 10 mg/L. *Schizosaccharomyces* pode ser encontrada no mosto de uvas ou no vinho. Os seus micélios podem formar-se e produzir ascósporos esféricos ou elipsoidais. As principais espécies encontradas em mostos de uvas e no vinho são *S. pombe* (Fugelsang *et al.*, 2007).

O crescimento de forma incontrolada das leveduras pode levar a alterações organolépticas nefastas no vinho. Estudos desenvolvidos por Blondin *et al.* (1982), evidenciam que os nichos ecológicos mais importantes que se conhecem para *Dekkera/Brettanomyces* são as barricas de carvalho, tão amplamente utilizadas no estágio de vinhos (Fugelsang *et al.*, 2007).

As propriedades físicas da madeira são predominantes para que se agravem os problemas de controlo de *Dekkera Brettanomyces*, pois facilitam a disponibilidade dos nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. *Dekkera/Brettanomyces* apresenta uma aparente resistência ao sulfuroso, uma vez que são sensíveis ao SO₂ molecular, no entanto dentro das barricas, as borras e os precipitados de tartaratos formam uma barreira que pode ter influência no seu desenvolvimento (Fugelsang *et al.*, 2007).

Actualmente, alguns enólogos defendem que quanto mais velha for a barrica, maior será a protecção para a ocorrência de alterações nos vinhos promovidas pela acção de leveduras de alteração, no entanto, com a realização de vários ensaios verifica-se o **contrário**. Barricas de madeira nova são mais favoráveis ao seu isolamento, uma vez que a madeira ao ser nova apresenta uma menor porosidade. Para além deste factor, tem de se ter em conta o facto de *Dekkera/Brettanomyces* desenvolver uma enzima, a beta-galactosidase que ataca o dissacárido celobiose, produzindo glucose. Esta celobiose que se encontra nos vinhos com estágio em madeira, resulta em grande parte da queima das barricas durante o seu processo de fabrico (Gonçalves, 1996).

A presença de *Dekkera/Brettanomyces* provoca o enaltecer de aromas desagradáveis que fazem com que os vinhos sejam rejeitados pelos consumidores, no entanto, alguns enólogos estudam e já utilizam controladamente algumas leveduras de contaminação para aumentar a complexidade e o *bouquet* do vinho. No entanto, a maioria dos enólogos, não as utiliza e limita apertadamente o seu desenvolvimento pois ainda existem muitas dúvidas a este respeito (Gonçalves, 1996).

1.2 - OBJECTIVO

Os vinhos, ao longo da sua estabilização, sofrem muitas alterações microbiológicas, sendo muitas destas notórias pelo seu aspecto positivo na sua componente aromática e gustativa. Muitas destas alterações contribuem positivamente para a melhoria dos vinhos, e o consumidor aprecia-as.

Por outro lado, algumas alterações desencadeadas por alguns microrganismos são depreciativas para os vinhos, conferindo-lhes aromas e sabor desagradáveis. Este tipo de situações é bastante penalizador para o sector, causando situações que em termos qualitativos e económicos bastante desagradáveis.

O estudo desenvolvido teve como objectivo a avaliação do tipo de microflora existente nos vinhos das amostras em estudo, principalmente ao nível das leveduras de alteração, durante o decorrer do estágio destes vinhos em barricas e em cuba de inóx.

CAPITULO II – PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

2.1. BREVE REFERÊNCIA À REGIÃO VITIVINÍCOLA

A Região de Lisboa (designada por Estremadura até 2009) é, de todas as províncias, a que manifesta uma complexidade mais acentuada, começando pelo aspecto geológico (Ghira, 2010).

O tipo de vegetação da parte Norte, apresenta características mediterrâneas e as terras de aluvião contrastam com as encostas onde abunda o calcário secundário, enquanto, as suas várzeas se opõem aos maciços montanhosos da fronteira oriental (Ghira, 2010).

A vinha, ainda que com uma grande capacidade de adaptação aos diversos tipos de solos, encontra na diversidade da região manifesta preferência por alguns destes, designadamente os solos calcários pardos ou vermelhos de margas ou parabarros e arenitos finos, os solos mediterrânicos pardos ou vermelhos normais e ainda os solos litólicos não húmidos, estes com representação na parte mais setentrional da região. A presença da grande metrópole que é Lisboa, apesar de localizada num extremo da região de Lisboa, marca de forma indelével e cada vez mais, os hábitos sociais da região. O carácter de ruralidade que durante longos tempos caracterizou de forma geral a população, apenas alterado em pólos perfeitamente definidos com a industrialização introduzida a partir do século XIX, foi muito afectado com o desenvolvimento do sistema viário, com destaque para a espinha dorsal que recentemente passou a ligar Lisboa a Leiria (Ghira, 2010).

2.1.1. A SUA APTIDÃO VITIVINÍCOLA

No alto do Montejunto pode-se observar a longa manta verde que se estende, e verifica-se que não é difícil concluir que muitos dos retalhos dessa manta são parcelas de vinha, alinhadas em direcções diversas, procurando o jeito ondulado do terreno (Ghira, 2010).

O século XIX foi marcado por uma época de sobreprodução de vinho, sendo um período marcado por uma série de factos gravosos para a cultura da vinha. O início foi drasticamente marcado com as invasões francesas que, para além de levarem ao abandono de muitas propriedades, após actos de saque generalizado na rota seguida pelos invasores, motivaram ainda, nomeadamente a Sul de Torres Vedras, o desvio de toda a mão-de-obra rural para a edificação da defesa de Lisboa, assente nas conhecidas Linhas de Torres (Ghira, 2010).

Mais tarde, mas no decorrer do mesmo século, o ataque praticamente generalizado a todo o país da terrível filoxera, insecto que atacava as raízes da videira europeia, levou à morte de grande parte do património vitícola nacional. Conhecida a solução, rapidamente as colinas desta região se viram de novo cobertas de vinhas que, com pujança rejuvenescida, passando a contribuir para uma produção de grande volume (Ghira, 2010).

A selecção de castas, a melhoria tecnológica, o reconhecimento de novas denominações de origem, conjuntamente com o esforço do viticultor e o saber do enólogo (Ghira, 2010).

Foram pedras basilares, para se atingir a situação actual, colocando os vinhos da Região de Lisboa num patamar qualitativo francamente meritório e que vem dar confirmação à continuidade da vocação vitivinícola da região (Ghira, 2010).

O clima é temperado em virtude da influência atlântica com verões frescos e invernos suaves, apesar das zonas mais afastadas do mar serem um pouco mais frias. (www.infovini.com).

2.1.2. A SUA DIVERSIDADE

Se considerarmos a cor, a riqueza alcoólica, a acidez, a estrutura, sem esquecer que o fruto da videira encontrou também na região algumas zonas particularmente vocacionadas para o consumo em natureza, estamos perante uma grande diversidade (Ghira, 2010).

Os grupos que integram esta diversidade, são: vinho com denominação de origem protegida (DOP), vinho de indicação geográfica protegida (IGP), vinho licoroso, vinho leve, vinho de mesa, aguardente vínica, aguardente bagaceira, espumante e uva de mesa.

2.1.3. AS SUAS DENOMINAÇÕES

Como consequência da diversidade da produção vitivinícola, parece perfeitamente natural que tenham assumido individualidade própria determinados topónimos que passaram a ser utilizados como denominação do produto vínico local (Ghira, 2010).

A região de Lisboa contempla as denominações de origem: Alenquer, Arruda, Bucelas, Carcavelos, Colares, Encostas d’Aire (Alcobaça e Medieval de Ourém), Lourinhã, Óbidos e Torres Vedras e ainda a indicação geográfica homónima ("Vinho Regional Lisboa") (Ghira, 2010).

Os vinhos que serviram de base neste estudo são da região de Alenquer, da casta Syrah, oriundos de vinhas destinadas à produção de vinhos com Indicação Geográfica Protegida (IGP), sendo denominados numa fase anterior à sua certificação, como vinhos aptos a IGP.

2.2. A CASTA SYRAH

Entre os factores determinantes da qualidade do vinho, a casta é uma das características que organolépticamente é mais facilmente detectada, por parte de técnicos qualificados (www.winexperts.terra.com.br).

A maior prova de qualidade de uma variedade de uva é a sua capacidade de produzir vinhos com aromas e sabores que a identificam e tipificam, mesmo que esses tenham sido influenciados pelo clima, pelo *terroir* e pela condução e instalação da vinha (www.winexperts.terra.com.br).

Nos países de grande tradição vitivinícola, como a França e a Itália, por exemplo, ocorreu, ao longo dos séculos, uma selecção natural de videiras, prevalecendo aquelas que melhor se adaptaram ao microclima local. Outros factores como resistência às pragas, qualidade e bom rendimento foram levados em conta. Essas cepas foram levadas posteriormente a outras regiões do mundo, sendo que algumas se adaptaram e outras, ou não se adaptaram ou perderam a tipicidade que apresentam no seu lugar de origem (www.winexperts.terra.com.br).

A casta Syrah destaca-se como uma das grandes uvas que chegaram aos nossos dias. É notável a qualidade dos vinhos originários destas uvas tanto no sul da França como em outras regiões do mundo, nomeadamente na Austrália, onde se adaptou maravilhosamente e ganhou o nome de Shiraz. (www.winexperts.terra.com.br).

2.2.1. ORIGEM DA CASTA SYRAH

A origem desta uva tinta majestosa, capaz de produzir vinhos com grande longevidade e de grande qualidade, é bastante controversa. Alguns estudiosos acreditam que a sua origem é siciliana, tendo ficado com o seu nome emprestado da cidade de Siracusa (www.winexperts.terra.com.br).

A hipótese que tem ganho maior corpo é a de que se trata de uma uva autóctone do Ródano, descendente da *Vitis allobrogica*, produzindo vinhos finos na região desde os tempos da dominação romana, como menciona o próprio Plínio nas suas obras (www.winexperts.terra.com.br).

É chamada Syrah no seu país de origem, a França, assim como no resto da Europa, Argentina, Chile, Nova Zelândia, Uruguai e na maioria dos estados dos Estados Unidos da América. Na Austrália o nome Shiraz tornou-se popular para essa variedade de uva, onde ela tem sido a variedade de película escura mais cultivada. Foi também, neste país, chamada correntemente de Hermitage até o final de 1980, mas, sendo esta uma denominação francesa de origem protegida, essa prática de nomeação causou problemas em alguns mercados de exportação e foi excluída (www.wikipedia.org).

Outros países têm cedido espaço para o plantio desta uva excepcional com ótimos resultados, como a Itália, África do Sul (onde é denominada Shyras) e Argentina.

2.2.2. CARACTERÍSTICAS DA CASTA SYRAH

Tal como já foi referido, trata-se de uma uva tinta com inúmeras qualidades, assim desta forma, tem dado corpo a grandes vinhos, grandemente conotados no Mundo, tais como: o Côte-Rotie, Saint-Joseph, Hermitage, Crozes-Hermitage, Cornas e Saint-Péray (www.winexperts.terra.com.br).

Esta casta, faz parte da vinificação de alguns dos vinhos do sul do Rhône, mas em conjunto com a Grenache (principal casta tinta da região), a Mourvèdre, a Marsanne e a Cinsault, estando assim, presente nos Châteauneuf-du-Pape e Gigondas, entre outras denominações regionais (www.winexperts.terra.com.br).

Trata-se de uma casta com uma boa adaptação aos climas quentes, como tem sido mencionado no sul da França, assim como apresenta uma excelente adaptação em terras australianas, para onde foi levada em 1832 por James Busby (www.winexperts.terra.com.br)

Ali foi usada durante muito tempo para cortes triviais, mas houve um sensível aumento na produção de vinhos de alta qualidade, especialmente de antigas vinhas em Barossa Valley. Actualmente, são produzidos os mais notáveis vinhos da Austrália, a partir desta casta, como o legendário Grange (ex Hermitage), da Penfolds (www.winexperts.terra.com.br).

É curioso que esta casta só tenha conquistado o resto do mundo após 1970, sendo notável também aumento da sua área de plantação fora da região do Rhône, na própria França, sendo esta mais notória em Languedoc-Roussillon, e também em outras regiões da Austrália, como Hunter Valley (New South Wales), Padthaway e Victoria (www.winexperts.terra.com.br).

Outros países têm cedido espaço para a plantação desta casta com que se obtêm ótimos resultados, como a Itália, África do Sul (onde é denominada Shiraz) e Argentina. Nos Estados Unidos, a Syrah está a viver um acréscimo de qualidade, o que lhe confere o apelo dos primeiros tempos da Pinot Noir, da Zinfandel e da Merlot, mostrando-se mais fácil de cultivar e vinificar do que as outras castas tintas, à excepção da Cabernet Sauvignon (www.winexperts.terra.com.br).

Em Portugal, tem sido muito cultivada nas zonas do Alentejo e Lisboa. Noutras nem tanto porque a casta Syrah necessita para o seu desenvolvimento e boa maturação, de zonas muito quentes para extrair o máximo da sua riqueza. Produz vinhos complexos e distintos, com grande complexidade de cor, bastante alcoólicos e com aromas e notas de prova de especiarias. Apesar da boa presença de taninos, o que lhe dá boa capacidade de envelhecimento, são vinhos que podem ser bebidos com grande prazer desde muito novos graças à redondez e macieza desses taninos (www.prazeresrequintados.blogspot.com).

É de salientar, a sua forte riqueza aromática presente nas suas notas de prova, destacando-se a forte presença de: especiarias (pimenta-do-reino preta), frutas escuras maduras (framboesa negra, groselha negra, amora), alcaçuz, couro, caça e alcatrão, além dos tostados e fumo. Além destes, são mencionados aromas de gengibre e chocolate, notas florais (violeta) e, em algumas regiões da Austrália, um toque discreto de hortelã (www.winexperts.terra.com.br).

Apesar de idênticas no aspecto vitivinícola, o resultado final é diferente devido às diferenças de *terroirs* e vinificação. As uvas desta casta produzidas na Austrália são mais doces e maduras, sugerindo chocolate; enquanto as Francesas produzem um vinho mais amplo sabendo a pimenta e especiarias. No nosso país, assiste-se a uma presença consolidada destas notas aromáticas, assim como a sua presença no perfil gustativo (www.winexperts.terra.com.br).

2.3. MICRORGANISMOS DE ALTERAÇÃO

2.3.1. FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos filamentosos frequentemente são encontrados nas uvas, como por exemplo *Aspergillus*, *Botrytis* e *Penicillium*, e, em menor quantidade, *Phytophthora*, *Moniliella* e *Cladosporium*. O seu desenvolvimento desempenha um papel importante na estabilidade físico-química, bem como nas propriedades sensoriais do vinho a que estas uvas irão dar origem. No entanto a sua proliferação, descontrolada, em uvas antes da colheita, rapidamente leva a um crescimento de contaminantes secundários (leveduras e bactérias), que, por sua vez, leva a um estado de deterioração designado "podridão." Dependendo da incidência e da forma em que a podridão está presente, o enólogo pode entender alterar o processo de vinificação que anteriormente se encontrava estabelecido. Apesar de não serem tolerantes ao etanol, os fungos encontram-se presentes nas adegas e estão presentes nas superfícies, bem como no ar (Fugelsang *et al.*, 2007).

Num estudo detalhado das caves de armazenamento do vinho, Goto *et al.* (1989) isolou 108 estirpes de fungos. As amostras pertenciam a seis géneros, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geosmithia*, *Penicillium* e *Verticillium*. Os fungos são capazes de se desenvolver em variadíssimos locais numa adega assim como em equipamentos, em que a sua presença produz metabolitos sensorialmente poderosos, podendo desempenhar um papel significativo da qualidade do vinho (Fugelsang *et al.*, 2007).

O género *Aspergillus* (fungo preto) tem reprodução assexuada e pertence à *Deuteromycetes* (ex: Fungos imperfeitos). O seu crescimento inicial aparece como um micélio branco semelhante ao *Penicillium*, mas como conídios maduros, e a colónia desenvolve um micélio negro. A espécie, *A. niger*, desempenha um papel importante na podridão, particularmente em climas quentes, o que levou à sua descrição como o "tempo do fungo *Aspergillus* ", juntamente com um segundo fungo, *Rhizopus* e bactérias acéticas, que também estão associados a podridão ácida (Fugelsang *et al.*, 2007).

Botrytis (fungo cinzento) é provocado por *B. cinerea* e pode afectar uma grande variedade de plantas. A doença é incentivada por condições de humidade e é caracterizada por uma coloração cinza na superfície do fungo. A presença de *Botrytis cinerea* na maioria dos casos, diminui a qualidade da uva, no entanto, as infecções por vezes são incentivadas, para produzir vinhos de alta qualidade (denominados vinhos oriundos de podridão nobre). Após a germinação, as hifas de *Botrytis* entram nos bagos por fissuras microscópicas e outras lesões. Quando as condições atmosféricas apresentam humidade relativa alta (> 90%), o ciclo de germinação para a esporulação pode levar menos de três dias. Temperatura óptima e humidade relativa de infecção situa-se entre 15 ° C/59 ° F e 20 ° C/68 ° F e > 90% RH. Sob essas condições, o crescimento de *Botrytis*, bem como de fungos indígenas (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Rhizopus*) e bactérias acéticas, produzem rapidamente "podridão" (Fugelsang *et al.*, 2007).

Penicillium (fungo azul-verde) é um género diverso, com mais de 200 espécies reconhecidas. As colónias normalmente crescem bem e esporulam em meios laboratoriais, produzindo cores cinza-esverdeado ou cinza-azul (Fugelsang *et al.*, 2007).

P. expansum (anteriormente denominado *P. glaucum*) é frequentemente isolado e é também conhecida como "fungo de podridão ". Esta espécie é a principal fonte das micotoxinas, em sumos de frutas e no vinho. A maioria das espécies de *Penicillium* cresce bem em mais baixas temperaturas, 5 ° C/41 ° F (Fugelsang *et al.*, 2007).

Os fungos filamentosos podem produzir metabolitos que perturbam a ecologia e o crescimento das leveduras durante a fermentação alcoólica (Fugelsang *et al.*, 2007).

Os efeitos do desenvolvimento destes fungos nas uvas, nomeadamente de *B. cinerea*, são notórios sendo de salientar: a perda de peso nos bagos, a produção de fitoalexinas, a acumulação de enzimas exocelulares fitotóxicas, a síntese de uma enzima polifenoxidásica, a-lacase e a degradação dos açúcares da uva (glucose e frutose). A degradação dos ácidos orgânicos da uva, sobretudo ácido tartárico, o aparecimento de heteropolissacarídeos, a produção de substâncias antibióticas, o aumento dos teores de glicerol, o aumento dos teores de outros álcoois superiores como manitol, a acumulação de

ácido glucónico, a produção de ácido glucurónico, a produção dos ácidos galacturónico e múxico, o ligeiro aumento das concentrações de ácido acético e de ácido cítrico são outros aspetos relacionados com o desenvolvimento destes fungos. A degradação de substâncias azotadas das uvas, o aparecimento de substâncias mucilaginosas, a modificação dos compostos aromáticos, a síntese de novos compostos voláteis, a diminuição do índice de compressão dos bagos, o aumento do índice de destacamento do pedicelo dos bagos e a alteração da população de leveduras são aspectos que tem a ver com o desenvolvimento destes fungos nas uvas (Fugelsang *et al.*, 2007).

Os efeitos do desenvolvimento de fungos filamentosos, nomeadamente de *B.cinerea*, trás muitas consequências aos vinhos, das quais se destacam: a diminuição dos teores de SO₂ livre, o aumento dos teores de açúcares e de ácidos orgânicos, o aumento da acidez volátil, a alteração da composição da fracção volátil dos vinhos podendo comprometer o envelhecimento dos vinhos. Fungos como o *Aspergillus sp*, *Cladosporium sp*, *Mucor sp* e *Penicillium sp* são frequentemente responsáveis por um forte amargor e desvios aromáticos que começam nas uvas provenientes da transformação de aminoácidos e de certos compostos fenólicos da película. Isto confere características organolépticas fenólicas ou iodadas consoante se trate de vinhos tintos ou de vinhos brancos, respectivamente (Fugelsang *et al.*, 2007).

Outros efeitos do desenvolvimento de fungos filamentosos, destaca-se: a produção de geosmina, produção de micotoxinas (Ocratoxina A, patulina, citrinina, tricotecenos) (Fugelsang *et al.*, 2007).

2.3.2. BACTÉRIAS

2.3.2.1 BACTÉRIAS LÁCTICAS

Lactobacillus representa um grupo altamente diversificado de bactérias Gram-positivas.

Dentro deste género existem espécies que são geralmente catalase-negativas, embora algumas decomponham peróxido. *Lactobacillus* spp. pode ser homo ou heterofermentativa tendo em conta o metabolismo da hexose (Fugelsang *et al.*, 2007).

Estas características fisiológicas são utilizadas para identificar algumas espécies de *Lactobacillus* que se encontram em mostos de uvas ou em vinhos. Várias espécies de *Lactobacillus* foram isolados a partir de uvas e vinhos do mundo inteiro, incluindo *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. diolivorans*, *L. fructivorans.*, *L. heterohiochii*, *L. hilgardii*, *L. jensenii*, *L. kunkeei*, *L. leichmanni*, *L. nagelli*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. trichodes*, *L. vermiforme*, e *L. yamanashiensis* (Fugelsang *et al.*, 2007).

As bactérias do género *Oenococcus* foram previamente classificadas como *Leuconostoc gracile*, *Leuconostoc citrovorum*, e *Leuconostoc oenos*. Mais tarde, estudos filogenéticos revelaram que *L. oenos* representa um subtítulo distinto que separa *Leuconostoc spp* dos outros. Dada a diversidade de características fisiológicas, como os padrões de fermentação de carboidratos, pensa-se que é possível que *Oenococcus oeni* (*O. Oeni*) poderá apresentar mais de uma espécie. Estirpes de *O. oeni* são descritas como Gram-positivas, anaeróbias facultativas, catalase-negativas, células esféricas elipsoidais. Pode ser difícil diferenciar microscopicamente as hastes curtas de *Lactobacillus*, uma vez que se trata de uma espécie heterofermentativa, convertendo glicose em quantidades equimolares de ácido d-láctico, CO₂ e etanol ou acetato. Apesar de apenas uma espécie ser atribuída a este género, pertence a *O. oeni* um grupo heterogéneo evidenciado pela grande variabilidade na fermentação com especificações de carboidratos (Fugelsang *et al.*, 2007).

A maioria das estirpes de *O. oeni* utiliza l-arabinose, frutose e galactose, ribose, mas não, lactose, maltose, melezitose ou xilose. *O. oeni* tem a capacidade de metabolizar o ácido málico encontrado nas uvas para formar ácido láctico através fermentação maloláctica, embora outras espécies de bactérias lácticas tenham sido investigadas e utilizadas para fins comerciais para a activação dessa fermentação (Fugelsang *et al.*, 2007).

Das espécies de *Pediococcus* apenas quatro foram isoladas em vinhos; *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus* e *P. pentosaceus* e vários investigadores já relataram o isolamento do *P. cerevisiae* a partir de vinhos, no entanto, actualmente esta espécie é considerada inválida porque representa pelo menos duas espécies, incluindo *P. damnosus* e *P. pentosaceus*. *P. damnosus* e *P. parvulus* são as espécies que mais correntemente são encontrados em vinhos. Estas culturas geralmente possuem a capacidade de formar L-lactato e ácido L-málico. *Pediococci* são quimioorganótrofos e têm exigências de crescimento complexas e exigências de aminoácidos. Além disso, estas são as únicas bactérias lácticas que se dividem em dois planos, o que resulta na formação de pares, tétradas ou grandes aglomerações esféricas (Fugelsang *et al.*, 2007).

Na prática, a fermentação maloláctica reduz consideravelmente a acidez total de vinhos e, conseqüentemente, aumenta o pH dos mesmos. Em termos analíticos, há um decréscimo de 1,0 até 3,0 g/L de acidez total equivalente em ácido tartárico e, acréscimo de 0,1 até 0,3 unidades de pH, tornando-se um factor fundamental em regiões onde há uvas com alto grau de acidez (www.revistaadega.uol.com.br).

Esta desacidificação ocorre devido à fixação do azoto no carbono terminal do lactato, ou seja, ácidos dicarboxílicos têm dois grupos ácidos que podem liberar prótons enquanto o ácido láctico contém só um próton que pode ser libertado. Um dos seus carbonos terminais é estável, pois um azoto foi fixado nesse carbono, deixando este ligado a três iões de azoto (www.revistaadega.uol.com.br)

Quanto ao impacto sensorial, o vinho torna-se menos agressivo e com aspectos gustativos bastante reconhecidos pelos consumidores. Apresenta formação e intensificação de aromas devido à síntese de compostos amanteigados e outras substâncias com estrutura similar. O factor fundamental para tornar o paladar do vinho mais agradável é a redução da acidez total (www.revistaadega.uol.com.br).

A diminuição da acidez em vinhos com alto índice de polifenóis totais significa menor amargor e menor adstringência, ou seja, não há uma intensa agressão dos taninos nas papilas gustativas o que é uma enorme vantagem para retardar o tempo nos lançamentos de vinhos tintos no mercado (www.revistaadega.uol.com.br).

Há ainda, várias mudanças nos aromas e sabores que acontecem no vinho durante esta fermentação. O diacetil é formado a partir da presença do piruvato que, por sua vez, foi sintetizado a partir do catabolismo ácido. O piruvato reage com o acetaldeído produzindo moléculas de acetolactato que são convertidas a moléculas de diacetil mais gás carbónico. O diacetil também reage com outros componentes dicarbonilados e com o enxofre de certos aminoácidos para a formação de aromas de avelã, chocolate, queijo, pipoca e noz-moscada (www.revistaadega.uol.com.br).

As bactérias lácticas também podem produzir alguns ésteres que contribuem positivamente no aroma do vinho. O lactato de etil, por exemplo, é descrito como aroma de frutas frescas, sendo formado a partir da reacção do ácido láctico com o etanol aumentando o carácter frutado. Outro éster importante é o succinato de dietil, o qual influencia muito o vinho, pois tem aroma adocicado. A sua formação dá-se a partir da reacção do ácido succínico com moléculas de etanol (www.revistaadega.uol.com.br).

Todas essas reacções e efeitos positivos durante a fermentação maloláctica, só ocorrerão se as condições para o seu desenvolvimento estiverem presentes. É aconselhável, para a realização de uma fermentação maloláctica, a adição de bactérias seleccionadas em dosagens aproximadamente de 1 grama por 100 litros de vinho, além do controlo dos seguintes factores:

- a) Adição de dióxido de enxofre – as dosagens devem ser pequenas, pois as bactérias lácticas são sensíveis a esse produto.

- b)** Presença de nutrientes – as bactérias necessitam de nutrientes para colaborarem nas conversões.
- c)** Oxigénio - A ausência estimula a fermentação maloláctica.
- d)** Temperatura – A temperatura óptima é de 20 a 37°C, já que em temperaturas abaixo dos 15°C o crescimento é inibido.

Não se pode obstar que é necessário um acompanhamento muito intenso durante a fermentação maloláctica. Análises cromatográficas colaboram para determinação da eficiência na conversão do ácido málico em ácido láctico. Da mesma forma, análises sensoriais com painéis treinados podem detectar os diferentes aromas e sabores formados durante este processo bioquímico e que irão, futuramente, repercutir-se de forma positiva no mercado consumidor (www.revistaadega.uol.com.br).

O vinho pode ter sido atestado, trasfegado, colado, filtrado e no entanto durante o Verão, no intervalo de duas provas e no espaço de duas ou três semanas, transforma-se bruscamente de forma desvantajosa. De repente aparece seco, magro, e floresce uma acidez volátil. Por vezes perde simplesmente a sua frescura e sabe menos bem, ou ainda torna-se gasoso, insípido, de cor ténue, com um cheiro desagradável a vinho doente (Peynaud, 1981).

Estas alterações foram descritas por Pasteur, com os nomes de volta, de amargor, de gordura, de fermentação manítica, no entanto actualmente são descritas como: fermentação do ácido tartárico ou volta, fermentação do glicerol com formação eventual de acroleína ou amargor, fermentação láctica dos açúcares do mosto ou pico láctico, fermentação láctica dos vestígios de açúcar e de pentoses, e gordura como manifestação paralela da fermentação maloláctica (Peynaud, 1981)

A volta define-se pela fermentação por vezes total do ácido tartárico do vinho, sendo esta transformação profunda tornando o vinho inconsumível (Peynaud, 1981).

Esta alteração ocorre em certas condições, sobretudo quando a acidez é baixa, atacando o ácido tartárico com formação de ácido láctico, de ácido acético e de gás carbónico (Peynaud, 1981).

O vinho com volta perde acidez fixa e ganha acidez volátil. O ácido essencial do vinho, que condiciona a sua força ácida, o seu gosto e o seu corpo a desaparecer, torna o vinho fraco e brando (Peynaud, 1981).

Um vinho tinto com volta, perde a vivacidade da sua cor, tornando-se apagado e acastanhado. O desenvolvimento microbiano turva o vinho e distinguem-se por vezes ondas sinuosas quando se agita o vinho no copo. É perceptível a presença de gás carbónico no vinho (Peynaud, 1981).

É muito sensível ao anidrido sulfuroso, mesmo combinado, no entanto esta doença é muito rara nas boas vinificações e em vinhos em boas condições de armazenamento e atestos adequados (Peynaud, 1981).

A fermentação do glicerol, é uma doença que graças às melhores condições de vinificação, se tornou muito rara. No entanto em anos problemáticos, em que as uvas têm uma maturação precoce, ou quando as uvas apresentam podridão, esta doença pode afectar vinhos de fraca graduação. Há produção de ácido láctico, ácido acético e certamente outros ácidos gordos. Pode haver produção de acroleína, que confere um gosto amargo no vinho (Peynaud, 1981).

O pico láctico intervém geralmente depois de uma subida excessiva da temperatura de fermentação, em que o desenvolvimento das leveduras abranda, pára e o vinho fica com açúcar. Se a fermentação alcoólica não arranca rapidamente pode-se frequentemente assistir ao aumento da acidez total e volátil (Peynaud, 1981).

O vinho alterado apresenta ao mesmo tempo um gosto acético e açucarado (agridoce). Estas alterações ao longo dos anos com o emprego adequado de anidrido sulfuroso, tem vindo a desaparecer (Peynaud, 1981).

A gordura, aparece em vinhos que não foram sulfitados, com grande quantidade de ácido málico transformado em que certos *Leuconostoc* da fermentação maloláctica, se rodeiam de uma substancia mucilaginosa, um polissacárido de tipo glucano, que liga as bactérias umas às outras e dá ao vinho o aspecto oleoso, ficando pesado, escorregadio e correndo sem barulho. A acidez volátil pode não ser elevada (Peynaud, 1981).

2.3.2.2 BACTÉRIAS ACÉTICAS

As bactérias acéticas são Gram-negativas, aeróbias, catalase-positivas. *Acetobacter* e *Gluconobacter* são descritos como tendo forma elipsoidal. As bactérias acéticas são divididas em quatro géneros: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconobacter*, e *Gluconoacetobacter* e *Gluconacetobacter hansenii*. As bactérias acéticas podem ser encontradas em ambientes ricos em açúcar onde o álcool está ausente ou presente em baixas concentrações, sendo estas condições típicas para que ocorra alteração dos produtos (Fugelsang *et al.*, 2007).

O pico acético está ligado às condições de atesto das cubas e das barricas. As bactérias acéticas encontram-se em todo o lado, nas uvas, nas adegas, nas paredes, nos solos, e no interior das barricas. Os vinhos com baixos teores de sulfuroso têm na sua constituição baterias acéticas durante toda a sua evolução (Peynaud, 1981).

Quando um vinho tinto é exposto ao ar, se é novo, inicialmente adquire flor e depois o pico, se for velho adquire o pico directamente. A acidez do vinho, representada pelo pH, é um factor primário: a um pH de 3,0 pode considerar-se o pico como impossível, enquanto que a pH 3,2 pode aparecer e é facilitado a pH 3,4. A temperatura é outro factor importante: a alteração é duas vezes mais rápida a 28°C do que a 23°C, e duas vezes mais rápida a 23°C do que a 18°C (Peynaud, 1981).

2.3.3. LEVEDURAS DE ALTERAÇÃO

As leveduras representam o grupo mais importante de microrganismos para os enólogos, uma vez que sem *Saccharomyces cerevisiae* não é possível produzir vinhos de qualidade. No entanto, existem muitos outros durante a fermentação alcoólica, que produzem um forte impacto na sua qualidade, positivamente e negativamente (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

A contaminação microbiológica não é facilmente definida, especialmente em alimentos fermentados e bebidas, onde os metabolitos produzidos contribuem para a alteração do sabor, aroma e sabor dos produtos finais. Na verdade, por razões culturais ou étnicas, há pouca diferença entre o que é percebido como desperdício ou actividade benéfica. Um exemplo disso pode ser encontrado na indústria do vinho, onde a produção de 4-etil-fenol por *Brettanomyces / Dekkera* spp. nos vinhos tintos é apenas considerado como deterioração quando este metabolito secundário está presente em níveis mais elevados do que cerca de 620 Ag / l. A menos de 400 Ag / l, contribui favoravelmente para a complexidade do vinho aroma por transmitir notas aromáticas de especiarias, couro, fumaça, jogo ou, apreciado pela maioria dos consumidores (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Acima de 620 Ag / l, os vinhos são claramente abaixo do padrão aceitável para alguns consumidores, mas continuam a ser agradáveis para os outros. Um dos mais recentes manuais da taxonomia de leveduras descreve as características de 761 espécies, destes cerca de um quarto pode ser isolado de alimentos, mas apenas um pequeno número desempenha um papel significativo na deterioração dos alimentos. Aqueles que podem sobreviver em alimentos, mas não são capazes de crescer e não afectam as características sensoriais dos alimentos podem ser chamados acidentais ou inocentes; os responsáveis de alterações indesejáveis são chamados de alteração leveduras (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

A actividade microbiológica pode desenvolver-se rapidamente e sem aviso. Desta forma, a identificação precoce de problemas de deterioração potencial é fundamental para a execução de soluções correctivas e preventivas (Fugelsang *et al.*, 2007).

Ao identificar os microrganismos em causa nem sempre a correcção é apropriada e simples, uma vez que um dado microrganismo pode trazer problemas de deterioração comprometendo a especificidade do vinho (Fugelsang *et al.*, 2007).

Kloeckera apiculata é muitas vezes referida como uma "levedura apiculada" devido à sua morfologia em forma de limão. Esta levedura, bem como outras presentes em mostos, como a *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia Metschnikowia*, e *Rhodotorula*, são também designadas de "leveduras nativas", "indígenas" ou "selvagens" porque elas têm origem na vinha ou na adega. Alguns enólogos têm argumentado contra o seu uso, uma vez que estas não se encontram no grupo "não-nativo" ou "não natural" (como por exemplo, *Saccharomyces* ou *Brettanomyces*). Pelo contrário, o termo "leveduras não-*Saccharomyces*" é agora mais correntemente utilizado para descrever as leveduras presentes em mostos, que não são do género *Saccharomyces* (Fugelsang *et al.*, 2007).

Durante o envelhecimento dos vinhos, algumas leveduras (*Candida*, *Hansenula* e *Pichia*) podem desenvolver-se na superfície dos vinhos devido à presença de oxigénio. Estas formam um filme sobre a superfície do vinho, o qual usualmente é associado a uma alteração. Estas leveduras são denominadas de "Leveduras de Véu" (Fugelsang *et al.*, 2007).

O género *Candida* representa um grupo muito amplo com um grande número de espécies encontradas nos vinhos (Fugelsang *et al.*, 2007).

As formas perfeitas ou teleomórfas de espécies de *Cândida*, são representadas por um número de géneros diferentes, incluindo *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, e *Zygosaccharomyces*. Como tal, *Candida* representa um grupo com uma ampla gama de características fisiológicas, e as suas células

podem aparecer como sendo microscopicamente globosas, elipsóides, cilíndricas ou alongadas. Vários podem ser os açúcares fermentados e o nitrato pode ser assimilado dependendo da espécie (Fugelsang *et al.*, 2007).

Hanseniaspora apresenta forma ovóide ou esférica (culturas jovens), apiculada ou em forma de limão (culturas mais antigas). A reprodução vegetativa é por gemulação em ambos os pólos. Apresenta ascósporos (um a quatro por asco), que são esféricos e podem formar-se em forma de Saturno. Espécies de *Hanseniaspora* tendem a ser frutofílicas em que a maioria prefere frutose (Fugelsang *et al.*, 2007)

Issatchenkia, apresenta gemulação multilateral, pseudomicélio, um a quatro ascósporos. A glicose é fermentada enquanto o azoto não é assimilado (Fugelsang *et al.*, 2007).

Como algumas leveduras, *Metschnikowia* também forma gémulas multilaterais e produz ascósporos em forma de agulha sem apêndices terminais. A espécie encontrada em mostos de uva e no vinho foi *M. pulcherrima*, que fermenta a glicose e pode assimilar uma série de compostos, incluindo glicose, galactose, sorbose-l, sacarose, maltose, celobiose, trealose, melezitose, d-xilose, N-acetil-dglucosamine, glicerol, etanol, d-manitol, d-glucitol, metil- α -d-glicose, salicina, d-gluconato, succinato e hexadecano, mas não de nitrato (Fugelsang *et al.*, 2007).

A espécie pode assimilar várias fontes de azoto, incluindo cadaverina, L-lisina, etilamina e tolera a 10 mg/L cicloheximida, no entanto é completamente inibida por 100 mg/L (Fugelsang *et al.*, 2007).

Um número de diferentes espécies de *Pichia* é reconhecido, incluindo dois encontrados em vinhos, *P. anomala* e *P. membranifaciens*. Outra espécie, *P. guilliermondii* (anamorfo: *Candida guilliermondii*) tem vindo a ser recuperado a partir de mostos de uvas e de equipamentos na adega que se encontram em contacto com mostos de uvas, mas não com vinhos. As células ao microscópio aparecem com forma ovóide, elipsóide ou cilíndrica e reproduzem-se vegetativamente por gemulação multilateral. O pseudomicélio pode ser pouco desenvolvido ou ausente. As suas colónias em meios sólidos apresentam-se de cor

branca ou creme e geralmente enrugadas. *P. anomala* fermenta a glicose e sacarose e assimila glicose, sacarose, maltose, celobiose, amido, melezitose solúvel, etanol, glicerol, eritritol, d-manitol, d-glucitol, α -metil-d-glicosídeo, salicina, dl-lactato, succinato, citrato e azoto. Quando *P. anomala* se desenvolve fermentativamente, é capaz de produzir 0,2% a 4,5% v/v de álcool juntamente com potencial de grandes quantidades de ácido acético, etil acetato e acetato de isoamila (Fugelsang *et al.*, 2007).

Saccharomycodes é um género representado por uma única espécie *Saccharomycodes ludwigii*, que aparece em forma de limão com ponta romba e também em forma de salsicha curvo ou alongado com um inchaço no meio (Fugelsang *et al.*, 2007).

Às vezes, as células são simples ou aparecem em pares ou em grupos de três e a reprodução assexuada ocorre por gemulação bipolar. *Saccharomycodes* produz ascósporos de formato esférico, com uma pequena borda (Fugelsang *et al.*, 2007).

Os açúcares fermentados incluem a glicose e sacarose enquanto os compostos são equiparados a glicose, sacarose, glicerol, cadaverina e etilamina, mas não de azoto. O crescimento é visível na presença de 1 mg/L cicloheximida, no entanto é inibida por 10 mg/L (Fugelsang *et al.*, 2007).

As células de *Schizosaccharomyces* podem ser cilíndricas, ovóides, ou mesmo esféricas. Das leveduras encontradas no mosto de uvas ou no vinho, o género reproduz-se exclusivamente por fissão. Os micélios podem formar-se e produzir ascósporos esféricos ou elipsoidais. As principais espécies encontradas em mostos de uvas e no vinho são *S. pombe*. Fermenta a glicose, sacarose, e maltose podendo assim assimilar a glicose, sacarose, maltose e d-gluconato. Esta espécie não pode utilizar o etanol como única fonte de carbono ou azoto como fonte de nitrogénio (Fugelsang *et al.*, 2007).

Zygosaccharomyces compreende nove espécies, das quais *Z. bailii*, *Z. bisporous*, *Z. rouxii* e *Z. florentinus*, que foram isoladas em mostos de uva e nos vinhos. *Saccharomyces rouxii* e *Zygosaccharomyces barkeri* são sinónimos de *Z. rouxii*. *Zygosaccharomyces* ao microscópico apresenta uma forma esférica, elipsoidal ou com células alongadas com

gemulação multilateral, possivelmente pseudohifas. Os ascósporos são lisos, esféricos, elipsoidais e com 1-4 por asco (Fugelsang *et al.*, 2007).

O número de açúcares é fermentado em função da espécie, e o azoto não é assimilado. *Z. rouxii* fermenta glicose e maltose e assimila glicose, trealose, glicerol, d-manitol, e d-glucitol. A morfologia das colónias celulares varia de acordo com os meios de isolamento, mas *Z. bailii* microscopicamente pode aparecer de forma cilíndrica. *Zygosaccharomyces* é haplóide e heterotálica, o que significa que a esporulação requer a união (conjugação) de dois tipos de acasalamento prévio compatível. Cada conjugação produz dois ascósporos lisos e redondos. Ao contrário de muitas outras leveduras, *Zygosaccharomyces* pode desenvolver-se em ambientes, tais como 60% w/w de glicose. Além disso, trata-se de uma levedura extremamente resistente a conservantes comuns usados em indústrias de produtos concentrados, e na enologia. A resistência ao SO₂ é devida à síntese de compostos extracelulares como o acetaldeído, assim como outros mecanismos não identificados. *Zygosaccharomyces* também é conhecida por ser extremamente tolerante ao álcool e pode desenvolver-se em vinhos contendo 18% v/v (Fugelsang *et al.*, 2007).

O conceito de leveduras de alteração, em vinhos foi introduzido pela primeira vez por Peynaud (1956), com base nos trabalhos de Domercq (1956), sobre a ecologia das leveduras de vinhos (Ferreira, 1990).

Embora a célebre frase de Pasteur “*le vin est plus saine et la plus hygiénique des boissons*”, em muitos aspectos, ainda se mantém actual, pois à partida o vinho não contém microrganismos patogénicos, o vinho será um produto de alta salubridade. Como refere Peynaud, “durante a sua preparação e conservação, o vinho não está ao abrigo de acidentes microbianos que podem depreciá-lo ou mesmo, em casos extremamente graves, torná-lo impróprio para consumo” (Gonçalves, 1996).

Apenas algumas espécies conseguem sobreviver no vinho acabado, podendo causar problemas de refermentações, turvações e sedimentos. Domercq (1956) refere como principais leveduras de alteração de vinhos as espécies *S.oviformis* (*S. cerevisae*), *S. acidifaciens* (*Z. bailii*) e *S. ellipsoideus* (*S. cerevisae*) (Ferreira, 1990).

As leveduras de alteração, aparecem sobretudo em vinhos tintos, no entanto também aparecem em brancos e espumantes. A sua presença poderá estar relacionada com reduzidos cuidados de higiene, a proximidade com destilarias ou subprodutos destas, que são prováveis focos de contaminação. Nas adegas, existem locais mais propícios ao seu crescimento, que são os locais de difícil higienização, tais como tubagens, equipamentos, válvulas, torneiras e outros locais que possam vir a acumular substratos ao longo do tempo e a partir desses poder ocorrer a sua disseminação. No entanto, não restam dúvidas que o local mais propício ao desenvolvimento deste tipo de leveduras são as barricas de carvalho, utilizadas para uma prática enológica, muito corrente, de estágio de vinhos (Gonçalves, 1996).

Vários géneros e espécies de microrganismos podem ser encontrados em mostos e vinhos em diferentes momentos durante o processo de vinificação. Por exemplo, *Saccharomyces*, *Brettanomyces* e *Pediococcus* podem ser encontradas no vinho. Durante o envelhecimento dos vinhos, várias leveduras e bactérias podem desenvolver-se, e muitas destas podem promover alterações no produto final (Fugelsang *et al*, 2007).

Alguns destes microrganismos são dominados por uma espécie ou por um grupo de microrganismos, que pode promover alterações durante a fase de estágio dos vinhos, no entanto, muitos destes podem existir num estado conhecido como "viável, mas não cultivável" (VBNC). O facto de não haver crescimento em meio de cultura adequado para tal, pode indicar morte microbiana, no entanto, os microrganismos no estado VBNC, podem deixar de crescer em meios de cultura e ainda apresentarem níveis baixos de actividade metabólica (Oliveira, 2005).

Normalmente, o estado VBNC é induzido em resposta a situações de stress, tais como: pressão osmótica, temperatura, concentração de oxigénio, entre outros. Uma das consequências de VBNC é a falha potencial de detectar microrganismos durante a fermentação alcoólica, levando a conclusões falsas sobre a dinâmica populacional (Fugelsang *et al*, 2007).

Na fermentação alcoólica, uma vez que as uvas são esmagadas, as leveduras indígenas multiplicam-se e atingem o pico da população durante os primeiros momentos da fermentação alcoólica (Fugelsang *et al.*, 2007).

Muitas leveduras indígenas possuem menor tolerância ao etanol em comparação com *Saccharomyces*. Esse factor, provavelmente, contribui para a morte dessas leveduras logo após o início da fermentação alcoólica, quando a concentração do etanol atinge 5% a 6% v/v (Fugelsang *et al.*, 2007).

A fase pós-fermentação é muito importante pois a distribuição de espécies de leveduras na cave de envelhecimento inclui *Dekkera/Brettanomyces*, leveduras de véu, *Saccharomyces*, e *Zygosaccharomyces*, as quais podem resultar na deterioração do vinho. Têm sido identificadas *Brettanomyces* spp., na alteração de vinhos um pouco por todos os produtores de vinho e nas várias partes do mundo. Acredita-se que *Brettanomyces*, pode-se instalar na adega através da importação de vinho contaminado, da má higienização das mangueiras, assim como dos depósitos ou outros equipamentos (Fugelsang *et al.*, 2007).

As barricas de madeira, são construídas com pranchas de madeira que foi previamente sujeita a uma criteriosa selecção e diversos tratamentos que promovem a estabilidade da madeira. No entanto, a madeira é constituída por diversos constituintes, nomeadamente fibras, promovendo a abertura de fissuras (poros). A madeira ao ser porosa, na construção das barricas faz com que fiquem pequenos intervalos entre as aduelas, assim como entre os tampos. As propriedades físicas da madeira contribuem significativamente para que os problemas de controlo deste tipo de leveduras se agravem, pois aumentam a disponibilidade de nutrientes, dos quais se destacam, o oxigénio e açúcares. Uma vez que estas leveduras são sensíveis ao sulfuroso molecular, seria de esperar que a idade das barricas fosse um factor adicional de protecção, uma vez que ao longo da utilização das barricas o sulfuroso também vai interagindo com a madeira mas, Blondin *et al.* (1982), pelo contrário, afirmam que as barricas de madeira nova são mais favoráveis ao isolamento destas leveduras do que as barricas usadas. Isto deve-se ao facto destas leveduras produzirem uma enzima, a beta-galactosidase, que ataca o dissacárido celobiose, produzindo glucose (Gonçalves, 1996).

As leveduras de alteração são bastante diferentes das leveduras de fermentação, pois têm uma actividade fermentativa muito mais fraca, podendo mesmo assim produzir 9 a 12% (v/v) de etanol e, em meio de glucose podem mesmo produzir grandes quantidades de ácido acético e alguns compostos secundários dos metabolismos, responsáveis por aromas desagradáveis, como os fenóis voláteis e as tetrahidropiridinas (Gonçalves, 1996).

Os defeitos provocados pela acção de leveduras de alteração, têm sido qualificados como simplesmente de carácter fenólico dos vinhos tintos, directamente proporcional à quantidade de etil-fenol presente. Entre estes estão o 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol. Vinhos com concentrações mais elevadas destes componentes podem exibir odor desagradável de "estábulo", "estrebaria", "suor de cavalo" (Silva, 2005).

Os limiares de percepção (LP) dos compostos 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol dependem da composição química do meio onde se encontram e alteram-se de acordo com a interacção entre eles (Fugelsang *et al*, 2007).

Para prevenir o desenvolvimento de leveduras de alteração nos vinhos a estagiar em barricas, deve-se ter em conta os atestos regulares das barricas, com a finalidade de diminuir a exposição do vinho ao oxigénio, assim como, a manutenção dos valores de sulfuroso molecular acima de 0,6 mg/L. É necessário e importante trabalhar sempre em condições de uma rigorosa higiene, para minimizar possíveis contaminações (www.viaderlab.com).

As leveduras de alteração, uma vez que necessitam de O₂ disponível para o seu desenvolvimento, tendencialmente procuram a superfície dos vinhos que estão em cuba de inox, uma vez que ao estarem junto à tampa superior da cuba, podem desenvolver-se por se encontrarem na presença de O₂. No caso dos vinhos que se encontram a estagiar em barricas de madeira, a probabilidade de se encontrarem leveduras de alteração é no fundo da barrica, pois em toda a superfície da barrica existe disponibilidade de O₂, mas junto às borras a disponibilidade de nutrientes e O₂ é notória, propiciando o seu desenvolvimento (www.viaderlab.com).

A flor, é provocada por leveduras micodérmicas, pertencentes à espécie *Candida mycoderma*. A acidez fixa baixa durante o seu desenvolvimento, podendo ficar com um gosto aguado por perda de acidez e de álcool, ficando normalmente turvo. É frequente em vinhos com baixos teores de sulfuroso e condições de atestos inadequados (Peynaud, 1981).

2.3.3.1. DEKKERA/BRETTANOMYCES

Van der Walt e Van Kerken (1958), num estudo sobre leveduras de vinhos sul-africanos, realçam a importância da espécie *Brettanomyces* spp.. Estes autores, afirmaram que esta espécie está ausente nas uvas e mostos, fazendo parte da flora contaminante do equipamento e ambiente das adegas, sendo particularmente perigosa para vinhos mantidos em depósitos, considerando-a uma levedura resistente ao etanol, conseguindo desenvolver-se em vinhos com 13% (v/v) de álcool, e resistente ao SO₂ (Ferreira, 1990).

Van der Walt & Van Kerken (1958), ao estudarem a ocorrência de *Brettanomyces*, citam a presença de outros géneros de leveduras mas não a presença de *Dekkera*. Isto deve-se ao facto de, naquela época, pensar-se que o género *Brettanomyces* não possuía a forma perfeita, ou seja, não formava ascósporos. No entanto, Van der Walt & Van Kerken (1960), citados por Van der Walt (1964), mostraram a formação destas estruturas (ascosporos) em algumas leveduras classificadas como *Brettanomyces*. Van der Walt (1964), com esta descoberta, transferiu as linhagens ascosporógenas para o género teleomórfico *Dekkera*, criando assim outro género (Silva, 2005).

O género *Brettanomyces* já era conhecido, segundo Smith *et al.*, (1990), desde 1904, quando Claussen, conseguiu isolar esta levedura a partir de cerveja inglesa no final da fermentação. O nome *Brettanomyces* é uma alusão ao termo "British" devido ao uso de espécies deste género na elaboração de cerveja fortemente aromática (Silva, 2005).

Só em 1940, Custer revelou os detalhes de *Brettanomyces* descrevendo a sua morfologia e fisiologia. O vigor na formação de ácido acético, o crescimento lento em agar de malte ou extracto de malte, o curto período de sobrevivência, a frequência de células ogivais e a

ausência de ascósporos, permitiram agrupar os integrantes deste género em quatro espécies e duas variedades (Silva, 2005).

Brettanomyces/Dekkera apresenta uma morfologia muito diferente das leveduras de fermentação, são mais pequenas, bastante heterogéneas devido ao tipo de gemulação que as caracteriza, apresentando algumas células em formas ogivais. Podem apresentar também formas elípticas, afiadas nas pontas, lembrando a forma de um limão (Gonçalves, 1996).

No fim da fermentação alcoólica, *Brettanomyces/Dekkera* só se desenvolve se tiver uma fonte de carbono e energia. No entanto, em vinhos supostamente secos, estas, poderão desenvolver-se mesmo em condições de anaerobiose, onde a fermentação vai ocorrer tendo em conta a pouca quantidade de açúcares disponíveis. O anidrido sulfuroso (SO₂) é um meio de luta bastante eficaz contra estas leveduras, uma vez que são sensíveis a níveis de 0,8g/L de SO₂ molecular, no entanto, o ácido benzóico, o ácido sórbico e o etanol também formam limites e barreiras ao seu desenvolvimento (Gonçalves, 1996).

Perceber que um vinho está infectado com *Dekkera/Brettanomyces* não é fácil, uma vez que o seu crescimento é lento, com fraca produção de CO₂ e muitas das vezes com ausência de película à superfície; só sendo perceptível quando os aromas do tipo “animal” (entre outros), resultantes da sua actuação, começam a aparecer, o que, na maior parte das vezes já é tarde demais (Silva, 2005).

Vinhos contaminados com *Brettanomyces/Dekkera* apresentam elevadas concentrações de ácido acético e tornam-se turvos. Nos casos mais graves, há formação de derivados do tipo 2-acetil-2-etil-tetraidro-piridina e acetil-pirolina, resultando em forte cheiro conhecido como "cheiro a rato" (Silva, 2005).

Para este tipo de problemas a prioridade é a prevenção. Assim, torna-se preponderante efectuar uma higienização eficiente de todos os equipamentos, de modo a evitar que qualquer resíduo sirva de suporte a *Dekkera/Brettanomyces* de uns anos para os outros, assim como, se deve eliminar outros focos possíveis de infecção tais como resíduos de bagaços e esgotos perto das adegas (Silva, 2005).

Em contraste com outras leveduras encontradas nos vinhos, *Brettanomyces* tende a crescer muito lentamente. O crescimento de *Brettanomyces* em barrica de envelhecimento de vinhos segue uma curva padrão que normalmente atinge uma densidade populacional máxima 5-7 meses após a vinificação. O tempo para o desenvolvimento do número de células máximas depende de muitos factores, mas inclui os nutrientes disponíveis e açúcares fermentáveis. Chatonnet *et al.*, (1995) sugere que concentrações muito baixas de açúcar residual de um vinho (0,275 g/L de glicose, frutose e galactose e trealose) será o suficiente para promover o crescimento desta levedura de alteração e prejudicar os aromas do vinho (Fugelsang *et al.*, 2007).

Durante a conservação dos vinhos na adega, deve-se ter muita atenção aos atestos, quer dos depósitos quer das barricas, assim como, se deve ter um controlo apertado dos níveis de sulfuroso livre, de modo a assegurar teores mínimos de oxigénio nos vinhos (www.viaderlab.com).

Desta forma, um vinho seco (açúcares redutores ≤ 4 g/L), é um vinho que poderá vir a potenciar o desenvolvimento de *Brettanomyces*, mesmo na garrafa e durante o seu envelhecimento (Fugelsang *et al.*, 2007).

Diversos descritores sensoriais têm sido utilizados para caracterizar *Brettanomyces/Dekkera* nos vinhos. Estes variam de "cidra", "cravo", "picante", "fumo", "couro", "cedro", "medicinal", "animal", "suor de cavalo", "lã molhada", "estrebaria", ou mesmo "esgoto" (Fugelsang *et al.*, 2007).

Esses odores são devidos à síntese de uma série de compostos voláteis incluindo 4-etil guaiacol e 4-etil fenol. O 4-etil guaiacol foi descrito sensorialmente como "cravo", e o 4-etil fenol como "fumo" ou "medicinal." Dada a grande variedade de descritores sensoriais dos vinhos infectados, mais odores característicos podem existir, e a utilização dessas estirpes podem melhorar a qualidade de alguns vinhos sem provocar odores ou sabores desagradáveis. O impacto sensorial de *Brettanomyces* depende do vinho, da sua estrutura e casta, bem como das preferências do produtor e do consumidor. Loureiro e Malfeito-Ferreira (2003), observaram que para alguns consumidores de vinhos não é questionável se

a concentração de 4-etil fenol ultrapassou 620 mg/L, enquanto outros não. Se estão presentes em concentrações inferiores a 400 mg/L, os autores sugerem que esse composto contribui para a complexidade do vinho e transmite descritores sensoriais da "especiaria", "couro" ou "fumo". Em contraste, Licker *et al.* (1999) descreveu uma grande contaminação com *Brettanomyces*, num vinho que continha 3000 mg/L de 4-etil-fenol, uma média contaminação com *Brettanomyces*, num vinho que tinha 1700 mg/L, e um vinho sem contaminação com *Brettanomyces*, num vinho com 690 mg/L (Fugelsang *et al.*, 2007).

Entre estes componentes estão os que apresentam aromas fenólicos e animais, lembrando "couro" ou "urina de cavalo" em vinhos tintos. Várias descrições para o aroma exalado pelo vinho devido à acção de *Brettanomyces/Dekkera* destacam-se, “estábulo”, “plástico queimado”, “suor de cavalo”, “couro molhado” e “animal molhado”. Há outras descrições como “fumo”, “cravo-da-índia”, “fenol” e “medicinal”. Na forma pura, enquanto o 4-etil-fenol exibe um aroma de “suor de cavalo”, o 4-etil-guaiacol exala aroma de “madeira queimada”, sendo, a presença destes dois componentes, fortes indicadores da presença de *Brettanomyces/Dekkera* (Silva, 2005).

A produção de fenol volátil varia com a estirpe de *Brettanomyces*, como descrito por Fugelsang e Zoecklein (2003), que relataram que 120 mg/L 4-etil guaiacol para uma dada estirpe e 440 mg/L 4-etil fenol produzido por outra estirpe. Bioquimicamente, 4-etil guaiacol e 4-etil fenol são originados a partir do ácido ferúlico e do ácido p-cumárico, respectivamente. A reacção é um processo que envolve duas etapas, uma descarboxilação inicial dos ácidos hidroxicinâmicos, catalisada pela cinamato-descarboxilase, e a redução do composto intermediário vinil-fenol pela enzima vinil-fenol-redutase (Fugelsang *et al.*, 2007).

Em barricas mantidas constantemente cheias, em cubas e em garrafas observa-se o aparecimento *Dekkera/Brettanomyces* (Chatonnet *et al.*, 1992).

Brettanomyces é capaz de utilizar o dissacárido celobiose, um dos hidratos de carbono resultantes do processo de queima necessária e importante no fabrico das barricas (Fugelsang *et al.*, 2007).

Ao longo dos últimos anos, a concentração de conservantes nos produtos alimentares têm sido reduzidos ao longo do seu processamento, o que contribui sem qualquer dúvida para a proliferação *Dekkera/Brettanomyces*. O anidrido sulfuroso e o ácido sórbico são actualmente os dois conservantes que são permitidos nos produtos alimentares e que impedem o seu desenvolvimento, no entanto os seus teores também têm sido reduzidos (Gonçalves, 1996).

A eliminação *Dekkera/ Brettanomyces* em barricas é muito difícil. No entanto, várias lavagens com água a temperatura superior a 70°C podem reduzir a população, mas em pequena escala. Ao verificar-se que a sua redução é diminuta, o uso de vapor torna-se obrigatório, pois será a única forma de obter resultados efectivos de eliminação de leveduras de contaminação (Fugelsang *et al*, 2007).

Ao efectuar-se um lote de um vinho contaminado e outro sem estar contaminado, estamos a disseminar em larga escala a contaminação. Ao serem trabalhados vinhos de origem desconhecida há que levar em linha de conta que este tipo de contaminação pode estar presente, devendo ser feito um rastreio. Nunca se pode descurar que a recolha de amostras deve ser feita antes da aplicação de sulfuroso, dada a sensibilidade destas leveduras a este conservante (Silva, 2005).

Os programas de detecção, que usualmente são feitos nas adegas, envolvem uma filtração, em membrana de porosidade 0,45µm, de um volume de vinho e posterior incubação em meio de cultura adequado, no entanto, é difícil o isolamento e recuperação *Dekkera/ Brettanomyces* (Silva, 2005).

No caso de vinhos que se encontram em barricas de madeira, se conseguirmos restringir o crescimento em determinadas barricas, este vinho pode ser lotado com outros. Muitos enólogos, nalguns países defendem que a adição de alguma quantidade de vinho com este tipo de contaminação num lote de vinho confere alguma complexidade aromática, tal como já foi referido anteriormente (Fugelsang *et al*. 1993).

No entanto, a generalidade dos enólogos são unânimes e, consideram que é necessário engarrafar sem, ou com um número muito reduzido de células viáveis *Dekkera/Brettanomyces* (Fugelsang *et al.* 1993).

Caso o vinho esteja infectado deve-se optar pela filtração por membrana, uma vez que esta confere uma redução no impacto sensorial do produto, especialmente quando se trata de um vinho tinto (Fugelsang *et al.*, 1993).

2.3.3.2. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Vários critérios devem ser levados em conta para que os microrganismos se desenvolvam. O meio de cultura deve conter uma fonte de compostos orgânicos de carbono (açúcar) para fornecer energia, de azoto para a síntese de aminoácidos, ácidos, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, bem como de vários outros compostos incluindo vitaminas e minerais. Além disso, o pH do meio de incubação, temperatura e condições ambientais (presença ou ausência de oxigénio) devem ser otimizados (Fugelsang *et al.*, 2007).

As necessidades de oxigénio e tolerância variam, dependendo do microrganismo em causa. De grande importância para os enólogos são os microrganismos que crescem sob condições onde o oxigénio está presente ou ausente (anaeróbios facultativos) (Fugelsang *et al.*, 2007).

Na vinificação existem dois grupos de bactérias anaeróbias facultativas, leveduras fermentativas, como *Saccharomyces* que são metabolicamente capazes de crescer tanto fermentativamente em mosto onde o oxigénio é limitado, ou na superfície do vinho como um véu, onde os vinhos se encontram expostos ao ar. No entanto, *Saccharomyces* não pode crescer por longos períodos sob condições anaeróbicas, devido à eventual falta de determinados componentes celulares sintetizados apenas em condições aeróbias (Fugelsang *et al.*, 2007).

Além de leveduras fermentativas, as bactérias lácticas possuem um metabolismo fermentativo e não requerem oxigénio. Estas bactérias podem crescer em condições aeróbias, mas crescem melhor sob atmosfera de oxigénio reduzida ("microaerofilia") (Fugelsang *et al*, 2007).

A concentração de iões de hidrogénio tem um papel importante nos meios de cultura e identificação dos microrganismos e pode ser usado para, selectivamente, promover o crescimento de uns sobre outros. Dependendo da composição do meio e o microrganismo envolvido, significativas mudanças de pH podem ocorrer quando as leveduras ou bactérias crescem. Por exemplo, o crescimento num meio rico em ácidos aminados e peptídeos podem libertar amónia (aumento do pH), enquanto o crescimento em açúcares produz ácidos (diminuição do pH), dependendo da capacidade de tamponamento do meio. Ambas as situações são, eventualmente, inibidoras e potencialmente tóxicas para os microrganismos (Fugelsang *et al*, 2007).

A técnica mais comum para reduzir o impacto moderado do ácido durante o crescimento em meios de cultura é através da incorporação de tampões fosfato, que são muitas vezes os agentes de escolha na preparação dos meios microbiológicos, uma vez que estes podem ser formulados para a função em torno de pH 7,0 (Fugelsang *et al*, 2007).

As leveduras, bactérias e fungos exigem níveis mínimos de humidade para o seu desenvolvimento. Durante a solidificação dos meios de cultura, a água liga-se ao agar e baixa a actividade da água (a_w) (Fugelsang *et al*, 2007).

Há muitos componentes que podem ser adicionados a um meio para seleccionar o crescimento de um microrganismo ou grupo de microrganismos sobre outros presentes. Estes agentes são denominados como agentes selectivos (Fugelsang *et al*, 2007).

Por exemplo, cicloheximida (actidione®) tem sido utilizada para seleccionar *Saccharomyces*, que geralmente é inibida em concentrações de 10 a 20 mg/L. Considerando que *Brettanomyces/ Dekkera* spp. sobrevive a 50 mg/L, é de extrema importância o recurso ao uso de um agente selectivo para se obterem dados conclusivos (Fugelsang *et al*,2007).

A cicloheximida pode ser adicionada a um meio, antes ou depois da esterilização. No entanto, a esterilização a vapor vai diminuir a actividade deste componente aproximadamente a metade (Fugelsang *et al*, 2007).

S. cerevisiae, é inibida geralmente em concentrações inferiores a 20 mg/L do componente activo e deve estar presente no meio antes da esterilização. Em alternativa, a cicloheximida pode ser filtrada em filtro estéril (0,45 µm) e, de seguida, ser adicionada assepticamente ao meio esterilizado (Fugelsang *et al*, 2007).

O objectivo da esterilização é matar ou remover fisicamente todos os microrganismos e esporos reprodutivos ou endósporos bacterianos. A esterilização dos meios de cultura e equipamentos pode ser realizada através da exposição a: (a) de água quente, (b) alta temperatura combinada com pressão (autoclave), (c) calor seco, (d) a remoção física (filtração), ou (e) produtos químicos (Fugelsang *et al*, 2007).

Numerosos meios de cultura são usados para o isolamento, detecção e/ou contagem de leveduras em mostos e vinhos. "WL" é o acrónimo para Wallerstein Laboratories, que originalmente comercializam este meio de cultura, muitas vezes chamado WL-Nutricional (WLN). WLN não contém cicloheximida e por isso é utilizado para a determinação do número total das populações viáveis de leveduras presentes no vinho. Este meio WL contém um indicador de pH, bromocresol verde, que permite a detecção rápida de colónias produtoras de ácido (Fugelsang *et al*, 2007).

O meio WL-Diferencial (WLD) ou WL-Cicloheximida (WLC) contém cicloheximida que é selectivo para *Brettanomyces* contra *S. cerevisiae* (Fugelsang *et al*, 2007).

É fundamental conhecer a concentração e especificações da cicloheximida presente na formulação do WLD, uma vez que alguns fornecedores adicionam apenas 4 mg/L, e para a inibição da *S. cerevisiae* são necessárias concentrações abaixo de 10 mg/L (Fugelsang *et al*, 2007).

Muitos enólogos adicionam 50 mg/L de cicloheximida ao preparem o meio selectivo WL para *Brettanomyces*. Embora não haja evidência, é possível que algumas estirpes de *Brettanomyces* sejam mais sensíveis a antibióticos do que se espera e por isso poderão não se desenvolver em meios com este agente (Fugelsang *et al*, 2007).

O meio de cultura DBDM (*Dekkera/ Brettanomyces* meio diferencial) foi desenvolvido por Rodrigues *et al.*, (2001) como um meio selectivo para a detecção de *Brettanomyces*, embora algumas estirpes poderão não ser capazes de utilizar o etanol como única fonte de carbono (Fugelsang *et al*, 2007).

O seu crescimento é lento, e ocorre durante um longo tempo de incubação (7-14 dias), sendo este o tempo necessário para a visualização de colónias de *Brettanomyces*. No entanto, alguns investigadores relataram ter visualizado colónias de *Brettanomyces* depois de 3 dias de incubação, no meio WLD (Fugelsang *et al*, 2007).

Uma vez que a *Brettanomyces* produz quantidades significativas de ácido acético, podem ser adicionadas quantidades de carbonato de cálcio (2% w/v) aos meios destinados para o desenvolvimento de bactérias acéticas (Fugelsang *et al*, 2007).

O antibiótico actidiona (cicloheximida) inibe a síntese proteica de eucariontes mas não de procariontes. Há géneros que são resistentes. *Dekkera* e *Brettanomyces* são exemplo de géneros resistentes a este antibiótico. Van der Walt & Van Kerken (1961) confirmaram a resistência da levedura *Brettanomyces* isolada no vinho à actidiona (cicloheximida) e ao

ácido sórbico. Embora não se consiga inibição de todas as outras leveduras, pelo menos as que interferem no crescimento de *Brettanomyces* parecem ser eliminadas (Silva, 2005).

D. bruxellensis não é mais resistente do que *S. cerevisiae* aos inibidores importantes, como etanol e dióxido de enxofre e, assim, provavelmente, os mecanismos subjacentes à capacidade de sobreviver em ambientes nutricionalmente pobres é a chave para explicar a sua proliferação, quando o ambiente se torna menos stressante (Loureiro *et al*, 2007).

A temperatura, a concentração de açúcar e o pH são factores que interagem na produção de fenóis voláteis provenientes do desenvolvimento de leveduras de alteração. A produção de 4-etilfenol por *D. bruxellensis* depende de vários factores, como a fonte de carbono, teor de etanol e temperatura. A concentração da fonte de carbono (glicose ou frutose) também influencia a produção de 4-etilfenol (Loureiro *et al*, 2008).

2.4. COMPOSTOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS

Durante o armazenamento do vinho, quando as regras de higienização não são escrupulosamente cumpridas ou quando os atestos não são eficazes, podem aparecer determinados aromas desagradáveis nos vinhos. O vinho encontrando-se de alguma forma exposto ao ar, depressa desenvolverá uma flora superficial de leveduras formando um véu, e oxidando o etanol. E assim, depressa produzirá concentrações indesejáveis de acetaldeído, esteres e ácidos voláteis. O acetato de etilo pode formar-se em quantidades que podem ser superiores ao seu limite de detecção sendo a sua produção estimulada em condições de aerobiose (Peynaud e Domerq, 1956).

2.4.1. ÁCIDO ACÉTICO

Algumas das leveduras de alteração são bastante acetogénicas, produzindo grandes quantidades de ácido acético quando crescem em meio que tem na sua constituição glucose (Peynaud e Domerq, 1956).

A acumulação de ácido acético resulta de uma baixa actividade das enzimas do Ciclo de Krebs, ou do desequilíbrio nos estados reduzido/oxidado da co-enzima envolvida na oxidação do etanol a ácido acético (Silva, 2005).

O doseamento do ácido acético livre e esterificado, a diferentes profundidades, em barricas novas que sofreram queima, ou nas aduelas de barricas usadas, permite mostrar que a grande maioria do ácido acético na madeira não está no estado livre, mas sob a forma de ésteres. O gradiente observado, em função da profundidade numa aduela usada, deixa antever que vai havendo uma hidrólise progressiva de ácido acético, que vai sendo, pouco a pouco, extraído pelo vinho. A madeira usada possui, um teor em grupos acetilados mais baixo que a madeira nova (Silva, 2005).

Um aumento de acidez volátil de 0,1g a 0,2 g/L, expresso em H₂SO₄, durante um ano de estágio em madeira é inevitável se se usarem barricas novas e não pode ser imputado ao desenvolvimento de bactérias acéticas ou leveduras. Este aumento deve-se a uma hidrólise química dos grupos acetilo das hemiceluloses da madeira. (Gonçalves, 1996).

2.4.2. FENÓIS VOLÁTEIS

Muitas das sensações menos agradáveis olfactivas e gustativas, que frequentemente se notam no vinho são difíceis de avaliar. As transformações que ocorrem no vinho, assim como a capacidade e intensidade com que elas se produzem, dependem de alguns factores, como o tipo e capacidade do vasilhame, presença de oxigénio, tipo de vinho, tempo que dura o armazenamento e a temperatura a que o vinho vai estar exposto (Gonçalves, 1996).

Desde tempos remotos a madeira foi utilizada em material de acondicionamento para o transporte de vinhos, no entanto não se pode considerar, de forma nenhuma, um material inerte. O vinho, ao sofrer alterações físico-químicas ao longo do estágio em barricas, é acompanhado de alterações organolépticas importantes que são bastante apreciadas pelos consumidores. Verifica-se que os vinhos tintos sempre tiveram uma grande tradição em estagiar em barricas de madeira. Há uns anos para cá verifica-se a mesma situação para os vinhos brancos, sendo estes muitas vezes fermentados em barrica. (Silva, 2005).

A madeira tem na sua constituição fenóis voláteis odoríferos e a queima das barricas desencadeia o aparecimento de compostos suplementares pela degradação térmica das lenhinas da madeira. Estes compostos modificam as características organolépticas dos vinhos conferindo-lhe aromas a fumo, especiarias, queimado, animal. O vinho ao estar em contacto com a madeira aumenta significativamente os teores em guaiacol, 4-metil-guaiacol, entre outros (Gonçalves, 1996).

Os vinhos tintos caracterizam-se por possuírem concentrações que muitas das vezes são elevadas, em etil-fenois (4-etil-guaiacol e 4-etil-fenol) enquanto no caso dos vinhos brancos, estes são praticamente desprovidos destes compostos (Chatonnet, 1995).

O limite de percepção de um dado composto corresponde à mínima concentração abaixo da qual 50% do painel de provadores não o conseguem detectar. Estabeleceu-se, assim, dois níveis de detecção: em solução modelo (meio hidroalcoólico com composição semelhante ao vinho), a que atribuíram o nome de Limite de Percepção (L), e em vinho

(vinho padrão), a que foi atribuída a designação de Limite de Recuperação (LR). Este valor funcionará como valor indicativo, uma vez que os vinhos não são todos iguais e a sua estrutura altera bastante. Este valor é muito importante, pois indica a concentração à qual o odor da substância estudada pode vir a ser detectado para além dos aromas do vinho (Chatonnet *et al.*, 1992).

**QUADRO 1 – Limites de percepção (L), de recuperação (LR) e de preferência (LP)
dos vários fenóis voláteis nos vinhos**

Concentração ($\mu\text{g/L}$)

Molécula	Limite de Percepção (L)	Limite de Recuperação (LR)		Limite de preferência (LP)	
		Vinho Branco	Vinho Tinto	Vinho Branco	Vinho Tinto
4-vinil-guaiacol	130	440	380	570	---
4-vinil-fenol	180	770	1500	-----	---
4-vinil-guaiacol+4-vinil-fenol (1:1)	----	390	----	350 + 375	---
4-etil-guaiacol	47	70	150	---	140
4-etil-fenol	440	600	605	---	620
4-etil-guaiacol+ 4-etil-fenol (1:10)	----	----	41 + 328	---	46 + 380

Adaptado de Gonçalves, (1996)

2.5. BARRICAS DE MADEIRA

2.5.1. BREVE ABORDAGEM HISTÓRICA

Não é de hoje a «polémica» que existente ao redor da utilização de diferentes tipos de carvalho (www.mariajoaodealmeida.clix.pt).

Se por um lado os melhores vinhos de mesa do mundo são envelhecidos em carvalho francês (uma madeira mais subtil), o carvalho americano (mais agressivo) ganha pontos junto do paladar do consumidor moderno, apesar do risco da madeira se sobrepor à fruta (www.mariajoaodealmeida.clix.pt).

O aroma a madeira deve-se à presença de um composto volátil (cis-metil-octalactona) que existe em todas as espécies de carvalho, variando a sua concentração de espécie para espécie e, por sua vez, da localização da mesma. O carvalho possui, assim, características únicas que o tornam na escolha ideal para o estágio dos vinhos (principalmente dos tintos). A maioria das madeiras, além de serem demasiado porosas, podem agregar aromas muito fortes que prejudicam o vinho, adicionar muitos taninos ou não possuir maleabilidade necessária para o fabrico de barricas (www.mariajoaodealmeida.clix.pt).

2.5.2. BENEFÍCIOS E TIPOS DE MADEIRA

Além da extracção de componentes da madeira (como aromas, sabores e taninos), os microporos da mesma permitem uma lenta entrada de oxigénio para dentro da barrica, ajudando a integrar e a arredondar as características do vinho. É através deste processo que os aromas evoluem. A lenta oxidação muda a cor dos vinhos tintos (que ficam mais escuros e violáceos) e dos vinhos brancos (que ficam mais escuros e dourados), mas também faz com que os aromas se tornem mais potentes.

(www.mariajoaodealmeida.clix.pt).

Durante o processo de tosta da barrica, são geradas várias substâncias que agregarão aromas e sabores ao vinho, como aldeídos responsáveis pelos aromas de tostado, vanilina que dá aroma de baunilha e vários fenóis, que agregam aromas de óleo de cravo, especiarias, fumado, entre outros, aumentando a complexidade aromática do vinho (www.mariajoaodealmeida.clix.pt).

2.5.3. MADEIRA DE CARVALHO NOVO VERSUS CARVALHO USADO

É natural que, ao longo do tempo, a transferência de substâncias para o vinho vá diminuindo. Em geral uma barrica é utilizada no estágio de vinhos por três vezes e depois vendida para uso em outras bebidas (www.mariajoaodealmeida.clix.pt).

É de salientar que a madeira usada, para ser novamente posta em contacto com o vinho, sofre um processo de higienização rigoroso, de forma a minimizar a inoculação e disseminação de problemas microbiológicos que possam comprometer o produto final. No entanto, em relação a uma barrica nova, salienta-se que os poros e canais da madeira, podem ser de difícil higienização, e para além disso permitem uma maior entrada de oxigénio nos espaços entre as aduelas (www.mariajoaodealmeida.clix.pt).

A disponibilidade de oxigénio num vinho que se encontra a estagiar numa barrica usada é maior do que num vinho que se encontra a estagiar numa barrica nova, uma vez que com o evoluir dos anos o espaço entre as aduelas vai aumentando e permite micro-entradas de oxigénio. Assim, a probabilidade de disseminação de leveduras de alteração é superior neste tipo de barricas do que nas novas (www.viaderlab.com).

2.6. O VINHO

2.6.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

O vinho é composto por água, álcool, ácidos, glicerina, açúcar, aminoácidos, carboidratos, monoterpenos, aldeídos e ésteres. Estes são responsáveis por variadíssimas características que identificam o vinho, como se pode verificar:

1. **Água:** é o maior componente do vinho, contribui com cerca de 80% de seu volume.
2. **Álcool:** é composto quase na sua totalidade pelo álcool etílico, e por uma pequena fracção de álcool metílico e outros. Forma-se a partir do açúcar na fermentação alcoólica, e representa em volume 5,5 a 17% do vinho. Admite-se que o grau alcoólico dos vinhos varia entre 9% v/v e 15% v/v, onde o álcool etílico representa de 72 a 120 g/L, glicerol (5 -10 g/L) e outros álcoois (metanol, isopropil, etc) em quantidades inferiores a 5 g/L. É de vital importância para os vinhos, tanto para a sua longevidade como para a sua qualidade, as suas propriedades antisépticas ajudam a inibir o crescimento de bactérias.
3. **Ácidos:** Os ácidos contidos no vinho podem ser provenientes da uva (tartárico, málico e cítrico) ou provenientes da fermentação (succínico, láctico, acético, butírico, fórmico, propiónico, carbónico) e estão presentes numa quantidade que varia de 5 a 7 g/L, o equivalente a 1 - 8% em volume. O ácido tartárico é o que sobressai e equivale a 50 a 90% dos ácidos na fruta. O ácido málico contribui com 10 a 40% e o ácido cítrico 0 a 5%. Os ácidos orgânicos encontram-se nos vinhos sob dois estados: a maior parte na forma livre e constitui acidez total e a outra parte na forma combinada ou salificada com as bases do vinho, sendo determinada pela alcalinidade de cinzas. O conteúdo de ácidos tituláveis, expressa em ácido tartárico, oscila entre 5,5 e 8,5g/L. Um vinho pobre em ácidos perde o sabor de maneira a ficar “enjoativo”, ao passo que, com excesso de ácidos fica “desequilibrado”.
4. **Glicerina:** é o mais importante subproduto da fermentação, transmitindo ao vinho sensação de doçura e redondez.
5. **Açúcar:** Composto sempre presente, mesmo em vinhos extremamente secos, que o possuem em quantidades infinitesimais. Os açúcares redutores são basicamente pentoses. Os vinhos fermentados completamente, sempre apresentam uma fracção

de frutose e um pouco de glicose; nos vinhos tintos, a glicose provém também, da hidrólise de certos glícidos durante a conservação. As quantidades de glicose e frutose na uva variam de 7 a 15% e outros açúcares como a arabinose e a xilose podem ser encontrados em quantidades infinitesimais.

6. **Aldeídos e ésteres:** Os aldeídos são formados pela oxidação dos álcoois e os ésteres resultam da combinação de ácidos e álcoois.
7. **Ácidos gordos:** os ácidos gordos no vinho têm origem nos firmes tecidos das uvas. Entretanto, a maior parte é formada durante a fermentação alcoólica, uma vez que os ácidos gordos podem ser libertados pelas leveduras. Estes compostos ocorrem, no vinho, de duas formas: livres (C_n , onde n é o número de carbono da cadeia alquílica do ácido) ou ligados, principalmente sobre a forma de etil ésteres, uma vez que o etanol é o álcool mais abundante neste ambiente (C_nE : éster etílico de ácido gordo). Os ácidos gordos contribuem muito para o sabor do vinho: possuem fortes aromas e odores característicos; os ácidos livres, indirectamente, como precursores de aldeídos e álcoois de seis carbonos, que possuem sabor herbáceo.
8. **Aminoácidos:** Os aminoácidos representam a mais importante forma de compostos azotados nos vinhos. Devido ao seu carácter poli funcional, os aminoácidos possuem uma grande reactividade química com respeito a compostos carboxilados, particularmente com açúcares, de acordo com a reacção de Maillard. Esta reacção leva a compostos alfa-dicarbonílicos, que são frequentemente encontrados nos vinhos após as fermentações alcoólicas e maloláctica. Nos vinhos, estes compostos estão em equilíbrio de oxiredução, isto é, com suas formas alfa-hidróxi-cetonas e alfa-dióis. Os aminoácidos têm grande importância no sabor do vinho, além de actuarem como precursores de outros compostos aromáticos. A formação destes produtos depende muito de diversas variáveis às quais o vinho pode ser submetido, como pH, temperatura, concentração de dióxido de carbono, exposição ao oxigénio e tempo de envelhecimento. A cisteína, leva à formação de heterocíclicos como pirazinas, metil-tiazoles, acetil-tiazolidina, entre outros, que contribuem largamente para o sabor final do vinho: estes compostos agregam aromas como o de nozes, fumo e enxofre. Por isso, o controlo rigoroso da quantidade de aminoácidos e os caminhos metabólicos sofridos por estes no processo de fermentação é extremamente importante, pois um descontrolo leva à perda de qualidade olfactiva.

9. **Carboidratos:** É natural estarem presentes no vinho muitos carbo-hidratos, afinal ele é feito a partir de um vegetal. E, de facto, existem muitas substâncias desta classe no vinho: tanto sacarídeos como poli-sacarídeos, tal como a celulose e hemicelulose. Existem, ainda glucosídeos ou poli-sacarídeos peptídicos, como a homogalacturonana, descrevendo os glucosídeos como uma fonte potencial para compostos aromáticos: embora não tenham odor, podem vir a libertar, mediante acção enzimática, álcoois e açúcares que contém odor e aroma característicos.
10. **Monoterpenos:** Vários estudos sugerem que boa parte da expressão sensorial do bouquet do vinho deve-se à presença de compostos terpenóides. Além disso, a relação entre as quantidades de cada terpeno num vinho pode servir como pista para se descobrir a variedade da uva utilizada. Hoje, conhecem-se cerca de 50 monoterpenos que aparecem nos vinhos. Os terpenos pertencem aos constituintes secundários das plantas, e sua biosíntese começa com a acetil-coenzima A (CoA). Estes compostos não sofrem alterações durante as fermentações no vinho: portanto eles são, de facto, uma assinatura de sabor ao vinho que vem da variedade de uva escolhida. Na uva, os terpenos estão principalmente nas cascas e, na maioria das vezes, ligados covalentemente a açúcares.

Compostos Fenólicos: Essas substâncias são constituídas por cinco grupos químicos: antocianinas, flavonas, fenóis-ácidos, taninos condensados, taninos catéquicos. Elas conferem aos vinhos a cor e grande parte do perfil gustativo. O sabor do vinho tinto e branco são diferenciados pela presença de compostos fenólicos em proporções mais elevadas nos primeiros. O total de substâncias fenólicas nos vinhos brancos é inferior a 350 mg/L e nos tintos até 3.000 mg/L (www.qmc.ufsc.br).

Outras Substâncias: Outras substâncias estão presentes no vinho em pequenas quantidades, porém, não deixam de ter o seu valor. São elas: Vitaminas: A, C, B1, B2, B6, Biotina, Niacina, Inositol e Ác. Pantotênico; Sais minerais: Na, K, Cl, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Cr, Si, I, B, Mo, Ti, V; Conservantes: P-V (SO₂ ou anidrido sulfuroso), P-IV (sorbato de potássio) (www.qmc.ufsc.br).

CAPITULO III – VINIFICAÇÃO E ESTÁGIO DOS VINHOS

3.1. BREVE CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA

A QUINTA DO MONTE D'OIRO, encontra-se localizada na região de Lisboa, sendo uma referência desde o séc. XVII na produção de vinhos notáveis. Desde 1986, sofreu uma reestruturação e procedeu à replantação das melhores parcelas, feito de forma criteriosa após vários anos de estudos sobre as condições edafo-climáticas, em conjunto com as castas que melhor se adaptaram aos seus desígnios, de forma a elaborar vinhos de alto gabarito, ao estilo europeu (“Velho Mundo”). Os seus vinhos caracterizam-se pela sua forma requintada com um forte sentido gastronómico, e com um perfil eminentemente talhado para acompanhar em perfeita harmonia pratos de uma genuína cozinha regional, cozinha clássica ou alta cozinha. Após os primeiros anos de consolidação de uma produção de vinhos de consistente alta qualidade, a Quinta do Monte d'Oiro entrou numa nova fase da sua história a partir da colheita de 2006, lançando para o mercado uma nova imagem e vinhos provenientes de uma conversão para a agricultura biológica. Os solos situam-se em excelente exposição, composição calcária e argilosa, do Jurássico Superior. Trata-se de um microclima mediterrâneo com influência atlântica, com noites geralmente frias, temperatura máxima estival de 31°C, pluviosidade média de 675 mm, com vento a soprar em permanência (www.quintadomontedoiro.com).

Dos 42 ha da propriedade, apenas 15,5 ha foram replantados com as castas Syrah, Viognier e Petit Verdot, importadas directamente das suas regiões originais em França, e com as castas portuguesas Touriga Nacional e Tinta Roriz. A preocupação de produzir uva com rendimentos baixos incrementa uma elevada qualidade enológica que se pretende dos vinhos (www.quintadomontedoiro.com).

3.2. DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO E ESTÁGIO DOS VINHOS

Os vinhos envolvidos neste estudo são tintos da casta Syrah, da colheita de 2009, oriundos de diferentes talhões, com exposição solar diferente.

A vindima foi realizada manualmente com selecção da matéria-prima. Foi feito o desengace sem esmagamento, e a fermentação decorreu em cubas de inox com reprodução da pisa a pé, com controlo rigoroso de temperaturas.

O estágio dos vinhos A e B, decorreram em barricas de carvalho francês (Radoux, Seguin Moreau e Taransaud, Saury e Damy), enquanto o vinho da amostra C permaneceu em cuba de inox durante o tempo da realização dos ensaios.

Os vinhos das amostras A e B, foram obtidos a partir de uma fermentação em cubas de inox com reprodução da pisa a pé, com controlo adequado de temperatura, maceração prolongada durante 10 dias e estágio ao longo de 18 meses em barricas de carvalho francês (Damy, Taransaud, Saury e Seguin Moreau), das quais 30 % são barricas novas.

O vinho da amostra C, foi obtido por fermentação em cubas inox com reprodução da pisa a pé e posteriormente à fermentação permaneceu em cuba de inox (www.quintadomontedoiro.com).

CAPITULO IV – MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1. MATERIAL

4.1.1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

O vinho é um produto natural obtido exclusivamente pela fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas ou dos mostos de uvas frescas (www.ivv.min-agricultura.pt).

O tempo de vida útil do vinho, depende do estado de conservação e armazenagem a que este é sujeito. Vários factores, tais como, a humidade, temperatura, exposição solar, atesto dos depósitos, exposição ao oxigénio, características da construção dos depósitos, higiene das instalações e equipamentos, podem ser primordiais para ditar a longevidade do vinho.

Os vinhos envolvidos nestes ensaios foram produzidos na Região Lisboa, oriundos da casta Syrah, na colheita de 2009.

Foram seleccionados 3 vinhos tintos, levando em conta as diferentes formas de estágio a que estes seriam sujeitos. As amostras foram identificadas como A, B e C. O vinho da amostra A foi subdividido em duas sub-amostras A1 e A2, pois o vinho da amostra A foi submetido a dois processos de estágio diferentes. Assim, a sub-amostra A1 corresponde ao vinho que estagiou em barricas de carvalho novas e a sub-amostra A2 corresponde ao vinho que estagiou em barricas de carvalho usadas.

O vinho da amostra B estagiou em barricas usadas e o vinho da amostra C, permaneceu em cuba de inox.

As barricas de madeira utilizadas em todos os ensaios têm uma capacidade de 225 litros.

4.1.2. MEIOS DE CULTURA

4.1.2.1 – MEIO CRB - ROSE BENGAL CHLORANPHENICOL AGAR

É um meio selectivo para a enumeração de fungos e leveduras, é recomendado em métodos de referência para a enumeração de leveduras e bolores de alimentos e bebidas.

A reacção enzimática faz a digestão do farelo de soja e fornece as fontes de azoto e vitaminas necessárias para o crescimento dos microrganismos. A alta concentração de glicose é incluída como uma fonte de energia. O fosfato é um agente tampão. O sulfato de magnésio fornece oligoelementos, e o Rose Bengal é incluído como um agente selectivo, para inibir o crescimento bacteriano e restringir o crescimento de fungos crescendo rapidamente. O Rose Bengal é incorporado nas células de bolores e leveduras, tornando estas colónias cor-de-rosa. O cloranfenicol tem um amplo espectro de inibição para uma ampla gama de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Fugelsang *et al*, 2007).

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO CRB- ROSE BENGALCHLORANPHENICOL AGAR EM G/L;

CRB - ROSE BENGAL CHLORANPHENICOL AGAR	g/L
Peptona	10 g
Dextrose	5 g
Fosfato de potássio	1g
Sulfato de magnésio	0,5 g
<i>Rose Bengal</i>	0,05 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agar	15,5 g
pH final	7,2 ± 0,2 a 25 ° C

Adaptado de Fugelsang *et al* (2007).

4.1.2.2 – MEIO WLN - WALLERSTEIN LABORATORY NUTRIENT

Meio utilizado no controlo microbiológico de bebidas fermentadas (vinhos, cervejas, sidras, espumantes etc.), visto privilegiar o desenvolvimento das leveduras e fungos filamentosos. A sua composição também permite o desenvolvimento de bactérias lácticas e acéticas.

**QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO WLN - WALLERSTEIN
LABORATORY NUTRIENT EM G/L;**

WLN – WALLESRSTEIN LABORATORY NUTRIENT	g/L
Extracto de levedura;	4 g
Casitona;	5 g
Dextrose;	50 g
Fosfato monopotássio (KH ₂ PO ₄);	0,055 g
Cloreto de potássio (KCl);	0,425 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂);	0,125 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄);	0,125 g
Cloreto férrico (FeCl ₃);	0,0025 g
Sulfato de manganésio (MnSO ₄);	0,025 g
Verde de bromocresol;	0,022 g
Água destilada;	800 ml

Adaptado de Fugelsang *et al* (2007).

4.1.2.3 – MEIO WLD - WALLERSTEIN LABORATORY DIFFERENTIAL

Este meio tem uma composição idêntica ao WLN, mas contém a actidiona de modo a inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e favorecer o crescimento de bactérias acéticas e lácticas. Neste meio a distinção entre bactérias acéticas e lácticas, normalmente é possível, uma vez que as colónias apresentam-se verdes enquanto que as das segundas são incolores, ou de cor clara (Fugelsang *et al*, 2007).

No entanto, este meio só inibe o desenvolvimento de *Saccharomyces cerevisiae*, mas no caso de estarem presentes nas amostras outras leveduras resistentes ao antibiótico actidiona, como é o caso de *Brettanomyces/Dekkera*, o seu desenvolvimento não é inibido (Fugelsang *et al*, 2007).

4.1.2.4 – MEIO DBDM - DEKKERA BRETTANOMYCES DIFFERENTIAL MEDIUM

Este meio combina a inibição de microrganismos promovendo a detecção de *Dekkera/Brettanomyces*, com a alteração de cor do meio de cultura, com produção de ácido e a formação de 4 – etil - fenol. Para isto, utilizaram o meio YNB 6,7 g/L (Yeast Nitrogen Base) (Difco) e adicionaram etanol (6% v/v), cicloheximida (10mg/L), ácido p-cumárico (100 mg/L), verde de bromocresol (22 mg/L) e agar (20 g/L) (Fugelsang *et al*, 2007).

4.1.2.5 – MEIO DE ETANOL (TESTE DE CONFIRMAÇÃO)

QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE ETANOL EM G/L;

Etanol	g/L
Extracto de levedura	10 g
Peptona	5 g
Água destilada	800 ml

Adaptado de Fugelsang *et al* (2007).

Uma vez que os ingredientes são dissolvidos, o pH terá de ser ajustado a 5,5 e os 15 g de agar devem ser adicionados antes da esterilização a 121°C /250 ° F por 15 min. Os 20 mL de etanol são dissolvidos em 200 mL de água destilada estéril e filtrados através de uma membrana de 0,45 µm (Fugelsang *et al*, 2007).

4.1.3. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

4.1.3.1 – FILTRAÇÃO POR MEMBRANA

A filtração por membrana é uma técnica que utiliza uma barreira física, sob a forma de membrana porosa ou filtro, para separar as partículas num fluído. Estas partículas são separadas com base no seu tamanho e forma, utilizando para tal o efeito da pressão e membranas especialmente desenhadas para o processo, apresentando poros com diferentes diâmetros. Embora haja diferentes métodos de filtração por membrana (osmose inversa, nanofiltração, ultrafiltração e microfiltração, em ordem crescente relativamente ao diâmetro dos poros da membrana), todos eles pretendem a separação ou concentração de substâncias num líquido (www.eufic.org).

Alguns dos ensaios deste trabalho foram efectuados submetendo as amostras a filtração por membrana. Esta filtração teve como finalidade permitir a concentração da amostra para aumentar a probabilidade de isolar os microrganismos aumentando a fiabilidade dos resultados analíticos.

4.1.3.2 – ESPALHAMENTO À SUPERFÍCIE

Consiste em espalhar o material (suspensão bacteriana na maioria das vezes) com o auxílio de um espalhador (para obtenção de tapete uniforme) por toda a superfície da placa de Petri. Deve-se ter o cuidado de garantir que toda a superfície da placa seja semeada (www.icb.ufmg.br).

4.1.3.2. COLHEITA DAS AMOSTRAS

A colheita das amostras, decorreu ao longo das várias fases de evolução do estágio dos vinhos, durante o período de Novembro de 2009 a Julho de 2010. O cronograma de colheita de amostras demonstra de uma forma simples todas as fases e alterações que estas sofreram.

QUADRO 5 – CRONOGRAMA DE COLHEITA DE AMOSTRAS

CRONOGRAMA DE COLHEITA DE AMOSTRAS	
<p>Novembro de 2009</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fim da fermentação alcoólica. - Os vinhos das amostras encontravam-se em cuba de inox. 	<p>1ª Colheita de amostras Ensaio 1</p> <ul style="list-style-type: none"> - Colheita de amostras directamente da provadeira das cubas.
<p>Dezembro de 2009</p> <ul style="list-style-type: none"> - Repetição do ensaio anterior. - o vinho da amostra B encontrava-se em fase de trasfega e não foi submetido a análise. - Posteriormente à colheita de amostras os vinhos das amostras A e B foram trasfegados. 	<p>2ª Colheita de amostras Ensaio 2</p> <ul style="list-style-type: none"> - Colheita de amostras directamente da provadeira das cubas.
<p>Março de 2010</p> <ul style="list-style-type: none"> - O vinho da amostra A tinha sido submetido a trasfega e dividido em sub-amostra AI (barricas novas) e AII (barricas usadas). - O vinho da amostra B foi trasfegado para barricas usadas. - O vinho da amostra C permaneceu em cuba de inox. 	<p>3ª Colheita de amostras Ensaio 3</p> <ul style="list-style-type: none"> - Colheita de amostras dos vinhos AI e AII foi efectuada directamente das barricas com o recurso a uma seringa. - A colheita da amostra do vinho C foi realizada na tampa superior da cuba.
<p>Abril de 2010</p> <ul style="list-style-type: none"> - As amostras permaneceram nas mesmas condições descritas anteriormente. 	<p>4ª Colheita de amostras – Ensaio 4</p> <ul style="list-style-type: none"> -A colheita das amostras foi realizada da mesma forma do ensaio anterior, no entanto, em vez de seringas foram utilizados tubos de inox para que a amostra do vinho das barricas fosse o mais próximo possível das borras.
<p>Mai de 2010</p> <ul style="list-style-type: none"> - As amostras permaneceram nas mesmas condições descritas anteriormente. 	<p>5ª Colheita de amostras – Ensaio 5</p> <ul style="list-style-type: none"> -A colheita das amostras foi realizada da mesma forma do ensaio anterior.
<p>Junho de 2010</p> <ul style="list-style-type: none"> - As amostras permaneceram nas mesmas condições descritas anteriormente. 	<p>6ª Colheita de amostras – Ensaio 6</p> <ul style="list-style-type: none"> - A colheita das amostras foi realizada da mesma forma do ensaio anterior.
<p>Julho de 2010</p> <ul style="list-style-type: none"> - As amostras permaneceram nas mesmas condições descritas anteriormente. - Perante os resultados do ensaio anterior a colheita de amostras sofreu alterações. 	<p>7ª Colheita de amostras – Ensaio 7</p> <ul style="list-style-type: none"> - a colheita de amostras do vinho AI, AII e B sofreu alterações em relação aos ensaios anteriores. A colheita foi efectuada directamente das barricas com o recurso a uma seringa (previamente higienizada indo esta completamente fechada) para cada uma das barricas

A primeira colheita de amostras teve lugar em Novembro de 2009, numa fase em que os vinhos tinham terminado a fermentação alcoólica há relativamente pouco tempo e ainda se encontravam nas cubas de inox. De cada uma das cubas, foram colhidas as amostras pela provadeira, em condições de assépsia, directamente para os frascos esterilizados. O volume de cada amostra foi de 500 mL.

A colheita de amostras realizada para o primeiro ensaio, foi extremamente importante para se avaliar a microflora total dos vinhos, e avaliar a sua estabilidade.

Em Dezembro de 2009, os vinhos A e B foram trasfegados para as barricas onde iriam efectuar o seu estágio. Assim o vinho da amostra A, tal como referido anteriormente, foi sub-dividido em duas sub-amostras A1 e A2. A sub-amostra A1 é constituída por vinho de quatro barricas novas e a sub-amostra A2 é constituída por vinho de vinte e quatro barricas usadas. O vinho da amostra B foi trasfegado para vinte e oito barricas usadas e o vinho da amostra C permaneceu em cuba inox.

Para os ensaios seguintes a colheita das amostras, foi efectuada directamente das barricas. Desta forma, levou-se em linha de conta o número de barricas que constituíam cada sub-amostra ou amostra, para se perfazer um volume de amostra final de 500 mL.

As amostras dos vinhos que se encontravam a estagiar em barrica, foram colhidas com o recurso a seringas (utilizando uma seringa por barrica) que previamente sofreram um rigoroso processo de higienização, para que desta forma não constituísse um foco de contaminação cruzada, entre as colheitas das amostras.

As seringas utilizadas na colheita das amostras foram sempre sujeitas a uma higienização rigorosa, 24 horas antes da realização dos ensaios, sendo todo este equipamento colocado numa solução alcalino clorada a 2%, produto específico para higienizações em indústrias alimentares, onde permaneceram, no mínimo, 1 hora.

Seguidamente, foram enxaguadas abundantemente de modo a remover toda a solução de higienização, ficando prontas a ser utilizadas. Com este processo de higienização, assegura-se que o material utilizado na recolha das amostras se encontra isento de contaminações microbiológicas, minimizando assim contaminações cruzadas.

Outro cuidado que foi levado em linha de conta, foi o facto de cada seringa ser utilizada unicamente uma vez. Ou seja, utilizava-se uma seringa para colher uma determinada quantidade de amostra de uma barrica (que já estava anteriormente predeterminado), e

perfazendo essa quantidade de amostra a colher dessa barrica, essa seringa era de imediato colocada no balde do material sujo, para que de seguida fosse sujeito a lavagem e higienização. Assim, minimizou-se outra possível porta de entrada a uma contaminação cruzada, pois caso o vinho de uma determinada barrica apresentasse algum tipo de contaminação, uma vez que o material usado na colheita de amostras não era usado em mais do que uma barrica, não iríamos inadvertidamente estar a propagar a contaminação, caso esta existisse.

No dia da realização dos ensaios, foi disponibilizado pelo laboratório todo o material necessário para a realização dos mesmos, incluindo os frascos esterilizados para a recolha das amostras.

Os frascos, foram colocados em saco térmico para assegurar a manutenção da temperatura, durante o transporte das amostras das instalações da Quinta até ao laboratório onde se realizaram os ensaios.

Ao longo da evolução dos ensaios, tendo como base a bibliografia consultada, verificou-se que a colheita de amostras teria de sofrer ligeiras modificações, pois no caso dos vinhos das barricas, ao colher as amostras com as seringas estas só colhiam o vinho que se encontrava na superfície da barrica.

De acordo com a bibliografia anteriormente citada, no caso dos vinhos que se encontravam a estagiar em barricas, a probabilidade de se encontrarem leveduras de contaminação é no fundo da barrica, pois em toda a sua superfície existe disponibilidade de O₂, mas junto às borras a disponibilidade de nutrientes e O₂ para o seu desenvolvimento é notória (www.viaderlab.com).

Com recurso a tubos de inox (previamente higienizados), conseguiu-se colher a amostra do vinho das barricas junto à borra, tendo assim uma amostra mais representativa do vinho no interior da barrica.

No vinho que se encontrava na cuba de inox, de acordo com a bibliografia, o cenário altera-se, pois as leveduras de contaminação uma vez que necessitam de O₂ disponível para o seu desenvolvimento, encontram-se na superfície dos vinhos que estão em cuba de inox junto à tampa superior da cuba.

Assim, a colheita das amostras passou a ser efectuada na tampa superior da cuba, em vez de ser pela provadeira da cuba.

Uma vez que não dispúnhamos de tubos de inox suficientes para todas as barricas, a sua distribuição foi feita como se encontra demonstrado no **QUADRO 6**:

QUADRO 6 – MODO DE AMOSTRAGEM

AMOSTRAS	Nº de barricas	Nº de seringas	Nº tubos de inox	Volume total de amostra
Sub-amostra A1	4 barricas novas	0	4	500 mL
Sub-amostra A2	24 barricas usadas	20	4	500 mL
Amostra B	28 barricas usadas	22	6	500 mL
Amostra C	Cuba inox	Colhidos na tampa superior da cuba		500 mL

Com estas alterações no modo de colheita das amostras, minimizou-se uma eventual perda de informação que estivesse a acontecer, pois é importante descartar todas as hipóteses. Eventualmente, os resultados das amostras dos vinhos que se encontravam em barrica, poderiam ser negativos, e na realidade este resultado ser um falso resultado tendo em conta que o modo de amostragem descartava algumas situações a ter em conta. Assim, com a alteração do modo de colheita das amostras, os resultados obtidos poderão ser mais consistentes com a realidade.

Este modo de amostragem foi seguido até ao final dos ensaios.

4.1.4. MÉTODOS

4.1.4.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram sempre colhidas no dia da realização dos ensaios, e transportadas para as instalações do laboratório, em saco térmico de forma a minimizar alterações de temperatura.

As amostras foram sujeitas a homogeneização, antes da realização das análises.

4.1.4.2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Tal como foi referido anteriormente, este estudo envolveu duas técnicas distintas de análise microbiológica, tendo sido alguns ensaios realizados pela técnica de espalhamento à superfície e outros pela técnica de filtração em membrana de 0,45 µm. Estas duas técnicas justificam-se pelo facto de os vinhos terem como característica uma forte concentração de compostos, o que impede e dificulta a sua filtração.

Os meios de cultura escolhidos para a realização dos ensaios foram:

- CRB, para de uma forma generalista ser possível avaliar o índice de população de bolores e leveduras existentes nas amostras;
- WLN, é um meio que permite o desenvolvimento de leveduras mas também de bactérias lácticas e acéticas. Permite tirar ilações acerca da população de leveduras em relação ao meio CRB e uma avaliação do tipo de bactérias que se encontram presentes nas amostras.
- WLD, contém actidiona de modo a inibir o crescimento de *Saccharomyces* e favorecer o crescimento de bactérias acéticas e lácticas. Neste meio a distinção entre bactérias acéticas e lácticas, normalmente é possível, uma vez que as colónias das bactérias acéticas apresentam-se verdes enquanto que as colónias das bactérias lácticas são incolores, ou de cor clara. Caso se verifique crescimento de leveduras neste meio de cultura, com toda a

certeza não se trata de *Saccharomyces*, e poderão ser leveduras de contaminação, daí ter sido escolhido este meio para despiste.

Como confirmação dos resultados obtidos neste meio de cultura utilizou-se o meio DBDM. Trata-se de um meio líquido específico para leveduras de contaminação do género *Dekkera/ Brettanomyces*, que permite assim efectuar um despiste correcto.

4.1.4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Tal como já foi referido anteriormente no ponto 4.1.4.2, os meios de cultura que estiveram envolvidos nos ensaios favorecem o crescimento de bolores e leveduras, no entanto, alguns deles tem na sua constituição inibidores de crescimento exercendo a sua selectividade.

O meio CRB, tal como já foi referido anteriormente é um meio selectivo para a enumeração de fungos e leveduras e é recomendado em métodos de referência para a enumeração de leveduras e bolores de alimentos e bebidas ficando as suas colónias coradas de rosa. Este meio dá-nos uma ideia geral da população de bolores e leveduras presentes nas amostras.

O WLN, trata-se de um meio de cultura utilizado no controlo microbiológico de bebidas fermentadas (vinhos, cervejas, sidras, espumantes, etc.) privilegiando o desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos. Dada a sua composição, permite também o desenvolvimento de bactérias lácticas e acéticas.

O WLD, é um meio que tem uma composição semelhante ao WLN no entanto, tem actidiona de modo a inibir o desenvolvimento de *Saccharomyces* e favorecer o crescimento de bactérias acéticas e lácticas. A distinção entre as bactérias acéticas e lácticas é feita pela sua cor, pois as bactérias acéticas apresentam-se verdes e as bactérias lácticas apresentam-se incolores.

O DBDM, é um meio líquido que combina a inibição de microrganismos promovendo a detecção de *Dekkera/ Brettanomyces*, com a alteração de cor do meio de cultura, com produção de ácido e a formação de 4 – etil- fenol.

CAPITULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Uma vez que os ensaios sofreram alterações ao longo da sua execução, os resultados serão apresentados por ensaio, para assim se avaliar comparativamente as suas diferenças.

ENSAIO 1

Este ensaio foi efectuado pela técnica microbiológica de filtração.

Os volumes que foram submetidos a filtração foram 1 mL, 10 mL e 100 mL, em filtros de 0,45 μ m e os meios de cultura envolvidos neste ensaio foram: CRB, WLN e WLD.

Foi inoculado 1 mL de cada uma das amostras em meio DBDM sendo este um meio específico para leveduras de alteração do género *Dekkera/ Brettanomyces*.

QUADRO 7 – RESULTADOS DO ENSAIO 1.

Novembro 2009	MEIOS DE CULTURA			
Amostra	CRB	WLN	WLD	DBDM
A	Incontável	Incontável	Incontável	Negativo
B	Incontável	Incontável	Incontável	Negativo
C	Incontável	Incontável	Incontável	Negativo

CRB – Rose Bengal Chloranphenicol Agar; WLN – Wallerstein Laboratory Nutrient; WLD – Wallerstein Laboratory Differential; DBDM - Dekkera Brettanomyces Differential Medium.

Uma das características dos vinhos envolvidos nos ensaios deste estudo, é a sua forte constituição de compostos taninosos e de cor, que propiciam a sua grande complexidade de cor e estrutura, apresentando-se bastante tapados e complexos. Estas características são mais evidentes em vinhos novos e com pouco tempo após a fermentação alcoólica, como é o caso destes vinhos, uma vez que muitos compostos se encontram em suspensão, aumentando a sua opacidade. Dada a grande dificuldade de filtração durante a realização

deste ensaio, os resultados foram pouco satisfatórios e inconclusivos, não permitindo assim ter uma percepção da microflora total presente nos vinhos. Desta forma, o ensaio sofreu uma repetição, abandonando nesta fase inicial a técnica de filtração sendo substituída pela técnica de espalhamento à superfície.

Quanto ao meio DBDM, em todas as amostras não se verificou odor característico do desenvolvimento de leveduras de alteração do género *Dekkera/ Brettanomyces*.

ENSAIO 2

Este ensaio foi uma repetição do ensaio anterior, dada a grande dificuldade de filtração das amostras referida no Ensaio 1.

Uma vez que um dos vinhos se encontrava em fase de trasfega para as barricas, só foram submetidos a este ensaio o vinho da amostra A e o vinho da amostra C. Tal como já foi referido anteriormente, a técnica microbiológica anteriormente seguida, sofreu uma alteração tendo em conta as características dos vinhos já enumeradas.

Assim, após a homogeneização das amostras, passou-se para a técnica microbiológica de espalhamento à superfície nos meios CRB, WLN e WLD.

Não foram efectuados os ensaios referentes ao meio DBDM, uma vez que este ensaio foi a repetição do anterior, e para o meio DBDM não havia necessidade da sua repetição pois os resultados obtidos no ensaio anterior foram conclusivos.

QUADRO 8 – RESULTADOS DO ENSAIO 2.

Dezembro 2009	MEIOS DE CULTURA		
Amostra	CRB	WLN	WLD
A	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/mL Leveduras: 9,0 x 10 ⁴ u.f.c./ mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/mL Leveduras: 1,5 x 10 ⁵ u.f.c./ mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Bactérias: Incontável
C	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/mL Leveduras: 8,3 x 10 ³ u.f.c./ mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/mL Leveduras: 1,9 x 10 ⁴ u.f.c./ mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: < 1 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/mL Bactérias: 9,0 x 10 u.f.c. / mL

CRB – Rose Bengal Chloranphenicol Agar; WLN – Wallerstein Laboratory Nutrient; WLD – Wallerstein Laboratory Differential;

Verificou-se que o vinho da amostra A em relação ao vinho da amostra C, apresenta valores de índice de microflora total, expressa pela população de leveduras, ligeiramente superiores. Uma vez que os vinhos tinham terminado há relativamente pouco tempo a sua fermentação alcoólica, naturalmente existe na sua composição leveduras. Tal como foi referido anteriormente, o meio CRB é um meio selectivo para o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras, no entanto, em ambos os vinhos não houve desenvolvimento de fungos filamentosos. Desta forma, com base na apreciação deste meio de cultura, verifica-se que ambos os vinhos apresentam na sua constituição leveduras.

Em meio WLN, verifica-se que o vinho da amostra A evidencia um desenvolvimento de leveduras superior ao vinho da amostra C, o que poderá estar relacionado com o facto da fermentação alcoólica não ter terminado na totalidade e ainda existir alguma viabilidade, estando esta situação presente nos dois vinhos. Esta situação é justificável pelo facto deste meio de cultura privilegiar o desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos.

Em meio WLD, o vinho da amostra A, revelou crescimento confluyente, sendo o resultado da avaliação das placas, incontável. Ao comparar os resultados obtidos em meio WLN e WLD verificou-se que, em meio WLN o desenvolvimento de leveduras corresponderia, provavelmente, a leveduras de fermentação do género *Saccharomyces cerevisiae*, pois esta mesma amostra de vinho em meio WLD não apresentou qualquer tipo de desenvolvimento de leveduras de fermentação (dada a presença de actidiona) assim como de outros géneros de leveduras. Dado que a presença de actidiona permite às bactérias o seu desenvolvimento e a sua evidência neste meio, este facto tornou-se notório nas placas de WLD, em que a sua leitura foi incontável para as bactérias.

Para o vinho da amostra C, este meio revelou colónias pequenas e verdes características de bactérias acéticas, no entanto, como algumas suscitaram dúvidas procedeu-se ao teste de confirmação em meio de etanol, o qual se revelou positivo.

Este ensaio em conjunto com o anterior, revelaram-se de grande importância como base de trabalho, pois uma vez que se conhece a microflora total de cada amostra, descartam-se hipóteses de contaminações presentes nas amostras logo numa fase inicial, podendo assim o acompanhamento dos ensaios posteriores revelar resultados conclusivos.

ENSAIO 3

O vinho da amostra A, tal como referido anteriormente, já se encontrava sub-dividido em duas sub-amostras AI (barricas novas) e AII (barricas usadas). O vinho da amostra B, já tinha sofrido uma trasfega para barricas usadas de onde foram colhidas as amostras deste ensaio, e o vinho da amostra C permaneceu em cuba de inox. Assim, após a homogeneização das amostras, passou-se para a técnica microbiológica de espalhamento à superfície nos meios CRB, WLN e WLD. Foi inoculado 1 mL de cada amostra em meio DBDM.

QUADRO 9 – RESULTADOS DO ENSAIO 3.

Março 2010	MEIOS DE CULTURA			
Amostra	CRB	WLN	WLD	DBDM
AI	Fungos Filamentosos: 1 u.f.c/ mL Leveduras: 2,5x10 ³ u.f.c/ mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/ mL Bactérias: 2,5x10 ³ u.f.c/ mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/ mL Bactérias: 6x10 u.f.c/ mL	Negativo
AII	Fungos Filamentosos: 8 u.f.c/ mL Leveduras: 1,9 x10 ³ u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/mL Bactérias: 1,5x10 ³ u.f.c/ mL	Fungos Filamentosos: 4x10 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/mL Bactérias: <1 u.f.c/ mL	Negativo
B	Fungos Filamentosos: 3 u.f.c/ mL Leveduras: 5,1 x10 ³ u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/mL Bactérias: 5,3x10 ³ u.f.c/ mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/mL Bactérias: 5x10 u.f.c/ mL	Negativo
C	< 1 u.f.c.	< 1 u.f.c	< 1 u.f.c	Negativo

CRB – Rose Bengal Chloranphenicol Agar; WLN – Wallerstein Laboratory Nutrient; WLD – Wallerstein Laboratory Differential; DBDM - Dekkera Brettanomyces Differential Medium.

O vinho da sub-amostra AI partiu da mesma matriz inicial que o vinho da sub-amostra AII. Desta forma, após a avaliação dos resultados obtidos em meio CRB verifica-se que, os valores da população de leveduras em ambos os vinhos são semelhantes, mas em relação ao ensaio 2, já se verifica uma ligeira diminuição. Esta situação é justificável, pelo facto de ao longo do evoluir da estabilização dos vinhos, assistir-se a uma diminuição da população de leveduras presentes na sua constituição. Esta diminuição tem a ver com o facto de a fermentação alcoólica estar a terminar, de os nutrientes disponíveis nos vinhos terem diminuído, assim como da aplicação de SO₂ e da presença de etanol, factores que limitam a viabilidade das leveduras. No entanto, salienta-se, que a este vinho não foram aplicados teores de SO₂ muito elevados pois dessa forma ir-se-ia inibir a fermentação maloláctica e esse não era o critério enológico a ser seguido.

No caso do vinho da amostra B, uma vez que no decorrer do ensaio anterior se encontrava em fase de trasfega, o que não permitiu a colheita de amostras, os valores obtidos em meio CRB serão considerados para a sua avaliação de microflora total. Estes, revelam que este vinho em relação às restantes amostras, encontra-se na mesma fase de estabilização, apresentando leveduras na sua constituição.

O vinho da amostra C, em meio CRB não revelou qualquer tipo de desenvolvimento. Tendo em conta que este vinho se encontrava em cuba de inox, os ensaios seguintes poderão ser conclusivos quanto a esta ausência de desenvolvimento.

Em meio WLN, os vinhos das sub-amostras AI, AII e da amostra B não apresentaram colónias características de leveduras, nem apresentam desenvolvimento de fungos filamentosos. Tendo em conta o que foi referido anteriormente, o WLN é um meio que privilegia o desenvolvimento microbiano de leveduras e fungos filamentosos, e permite o desenvolvimento de bactérias acéticas ou lácticas, que de facto, é o que é evidenciado nestas amostras, em que a população de bactérias se encontra na mesma ordem de grandeza em todas as sub-amostras dos vinhos AI, AII e da amostra B, e não apresentam desenvolvimento de leveduras.

Em meio WLD, os vinhos das sub-amostras AI, AII e o vinho da amostra B não apresentaram desenvolvimento de leveduras. De acordo com a bibliografia consultada, o meio WLD tem na sua constituição actidiona, inibindo o desenvolvimento de *Saccharomyces*, e favorecendo o desenvolvimento de bactérias acéticas e lácticas. No caso de se desenvolverem leveduras, sabe-se com base na bibliografia que não se trata de

Saccharomyces, o que aumenta a probabilidade de se tratarem de leveduras de contaminação, mas nestes ensaios, essa situação não se verificou. O vinho da sub-amostra AI e da amostra B, neste meio apresentam desenvolvimento de colónias características de bactérias acéticas, que após testes de confirmação em meio de etanol, deram resultado positivo.

O vinho da amostra C, não apresentou desenvolvimento microbiano em nenhum dos meios utilizados.

Em meio DBDM, nenhuma das amostras apresentou odor característico, sendo assim o resultado negativo.

Como conclusão final deste ensaio, verifica-se que o vinho da amostra C é o que apresenta uma maior estabilidade microbiológica, revelando pouco desenvolvimento microbiano em todos os meios de cultura. Quanto às restantes amostras verificou-se que em meio WLN, apresentaram desenvolvimento de bactérias, o que se confirmou em meio WLD. Tendo estas colónias sido sujeitas a testes de confirmação em meio de etanol, confirmou-se tratarem-se de baterias acéticas. Para todas as amostras os resultados obtidos em meio DBDM foram negativos, o que revela que não estão presentes leveduras resistentes à acidiona.

ENSAIO 4

As amostras encontram-se numa fase de estágio, sendo este ensaio encarado como um acompanhamento da evolução do estágio destas amostras.

O acompanhamento dos vinhos em fase de estágio é fundamental para detectar alguma situação de contaminação que se possa estar a desenvolver, e assim enologicamente actuar de forma a corrigir ou minimizar as suas consequências.

As amostras permaneceram nas mesmas condições, não havendo nenhuma alteração a registar.

A técnica microbiológica de espalhamento à superfície manteve-se.

QUADRO 10 – RESULTADOS DO ENSAIO 4.

Abril 2010	MEIOS DE CULTURA			
Amostra	CRB	WLN	WLD	DBDM
AI	Fungos Filamentosos: 2 u.f.c/ mL Leveduras: Incontável	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: 1,2x10 u.f.c/ mL Bactérias: <1 u.f.c/ mL	 Bactérias: Incontável	 Negativo
AII	Fungos Filamentosos: 5 u.f.c/ mL Leveduras: 3,0 x10 u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: 3 u.f.c/ mL Leveduras: 2,8 x 10 u.f.c/ mL Bactérias: <1 u.f.c/ mL	 Bactérias: Incontável	 Negativo
B	Fungos Filamentosos: 2 u.f.c/ mL Leveduras: 4,7 x10 ² u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: 2,7 x10 u.f.c/mL Bactérias: 5,9x10 u.f.c/ mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: 7,3 x 10 u.f.c/ mL Bactérias: <1.f.c/ mL	 Negativo
C	Fungos Filamentosos: 2 u.f.c/ mL Leveduras: 1 u.f.c/mL	 <1.f.c/ mL	 <1.f.c/ mL	 Negativo

CRB – Rose Bengal Chloranphenicol Agar; WLN – Wallerstein Laboratory Nutrient; WLD – Wallerstein Laboratory Diferential; DBDM - Dekkera Brettanomyces Diferential Médium.

O vinho da sub-amostra AI, em meio CRB revelou um desenvolvimento confluyente de leveduras, sendo incontável a sua avaliação. Este desenvolvimento confluyente de leveduras suscita algumas dúvidas quanto às estirpes de leveduras envolvidas, sendo os resultados obtidos nos restantes meios de cultura, fundamentais para se efectuar um despiste efectivo do que está a ocorrer. Este resultado causa algumas dúvidas, quando comparado com aos resultados do último ensaio, em que a população de leveduras se encontrava a diminuir.

Os resultados dos ensaios seguintes, poderão ajudar a interpretar estes resultados.

Em meio WLN, verifica-se que esta sub-amostra só revelou desenvolvimento de leveduras, não havendo desenvolvimento de bactérias nem fungos filamentosos.

Em meio WLD, verificou-se desenvolvimento confluyente de bactérias. Tendo em conta que este meio tem na sua constituição actidiona (antibiótico que inibe o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*) e que a cor das colónias era verde claro suspeitou-se que se tratavam de colónias de bactérias acéticas. Após teste de confirmação em meio de etanol, confirmou-se tratarem-se de bactérias acéticas.

Desta forma, concluiu-se que provavelmente as leveduras presentes seriam *Saccharomyces*, e que o seu desenvolvimento não foi possível neste meio de cultura devido à presença de actidiona. O meio DBDM, revelou resultados negativos os quais reforçam os resultados do anterior meio de cultura. Ou seja, o meio DBDM é mais uma confirmação dos resultados anteriores, confirmando a não presença de leveduras de alteração nesta amostra.

O vinho da sub-amostra AII, em meio CRB revelou desenvolvimento de leveduras, no entanto menor do que na sub-amostra AI.

Em meio WLN verificou-se desenvolvimento de leveduras, não havendo desenvolvimento de bactérias. No entanto, tal como na anterior sub-amostra, o meio WLD foi muito revelador ao manifestar um desenvolvimento confluyente, que após teste de confirmação, verificou-se tratarem-se de colónias de bactérias acéticas. Assim e tal como na sub-amostra AI, concluiu-se que as leveduras presentes seriam *Saccharomyces*, e que o seu desenvolvimento não foi possível neste meio de cultura devido à presença de actidiona. O meio DBDM, revelou resultados negativos os quais reforçam os resultados do anterior meio de cultura. Ou seja, o meio DBDM é mais uma confirmação dos resultados anteriores, confirmando a não presença de leveduras de alteração nesta amostra. O facto da avaliação dos resultados desta sub-amostra ser semelhante aos da sub-amostra AI, revela

que, como estas sub-amostras são oriundas do mesmo vinho (amostra A), o facto de terem sido sujeitas a estágio em barricas novas e usadas, não parece ser factor de alteração da sua microflora.

O vinho da amostra B, em meio CRB revelou crescimento de leveduras. Tal como nas anteriores sub-amostras AI e AII, este desenvolvimento confluyente de leveduras suscita algumas dúvidas quanto às estirpes de leveduras envolvidas, sendo os resultados obtidos nos restantes meios de cultura, primordiais para se efectuar um despiste efectivo do que está a ocorrer.

Em meio WLN, esta amostra revelou desenvolvimento de leveduras e de bactérias. Tal como nas amostras AI e AII, o meio WLD foi muito revelador apresentando um desenvolvimento confluyente de leveduras. Da avaliação do ensaio em meio DBDM, verifica-se que o resultado é negativo, não havendo a produção de aroma característico da presença de leveduras de alteração, ficando assim descartada a hipótese da sua presença.

O vinho da amostra C, em meio CRB revelou algum desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos. Em meio WLN e meio WLD, o crescimento foi muito reduzido. Em meio DBDM o resultado foi negativo.

Efectuando uma avaliação geral do ensaio, salienta-se que em meio WLN, os vinhos das amostras AI, AII e B apresentaram colónias características de leveduras, contrariamente ao ensaio anterior em que não se tinha verificado o seu desenvolvimento.

Este desenvolvimento de leveduras e algumas bactérias, poderão ser justificados com o facto de a colheita das amostras a partir deste ensaio ter sido efectuada com o recurso a tubos de inox.

Ao colher a amostra mais junto às borras, tal como foi referido anteriormente, há uma maior probabilidade de crescimento de microrganismos pois a disponibilidade de nutrientes e O₂ é superior.

O vinho da amostra C, não revelou resultados diferentes dos ensaios anteriores. Até ao momento foi o vinho que apresentou uma maior estabilidade microbiológica.

ENSAIO 5

Os vinhos continuaram o seu estágio e este ensaio é o evoluir do seu acompanhamento. As amostras permaneceram nas mesmas condições, não havendo nenhuma alteração a registar. A técnica microbiológica de espalhamento à superfície manteve-se.

QUADRO 11 – RESULTADOS DO ENSAIO 5.

Maio 2010	MEIOS DE CULTURA			
Amostra	CRB	WLN	WLD	DBDM
AI	Fungos Filamentosos: 3 u.f.c/ mL Leveduras: 1,3x10 ³ u.f.c/ mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: 8,2x10 ² u.f.c/ mL Bactérias: <1 u.f.c/ mL	Bactérias: Incontável	Negativo
AII	Fungos Filamentosos: 2,2 x10 u.f.c/mL Leveduras: 2,1 x10 ² u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: 1,5 x 10 ² u.f.c/ mL Bactérias: <1 u.f.c/ mL	Bactérias: Incontável	Negativo
B	Fungos Filamentosos: 6 u.f.c/ mL Leveduras: 3,0 x10 ² u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/ mL Bactérias: 1,2 x10 ² u.f.c/ mL	Bactérias: Incontável	Negativo
C	< 1 u.f.c.	1 u.f.c/mL	<1.f.c/ mL	Negativo

CRB – Rose Bengal Chloranphenicol Agar; WLN – Wallerstein Laboratory Nutrient; WLD – Wallerstein Laboratory Differential; DBDM - Dekkera Brettanomyces Differential Médium.

O vinho da sub-amostra AI, em meio CRB revelou desenvolvimento de leveduras, salientando-se uma diminuição desse desenvolvimento em relação ao ensaio anterior. Em meio WLN esta sub-amostra revelou desenvolvimento de leveduras, não havendo desenvolvimento de bactérias. Em meio WLD, o crescimento confluyente de microrganismos não permitiu a sua identificação imediata. O facto de não se desenvolverem leveduras no meio WLD, evidencia que as que se desenvolveram em meio CRB e WLN são *Saccharomyces cerevisiae* e não são leveduras de alteração. Por outro lado, as bactérias, que em meio WLN não conseguiram evidenciar-se face às leveduras, em meio WLD conseguiram desenvolver-se. O teste em meio de etanol mostrou tratar-se de bactérias acéticas. Em meio DBDM o resultado foi negativo.

O vinho da sub-amostra AII, em meio CRB revelou desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos.

Em meio WLN verificou-se desenvolvimento de leveduras, não havendo desenvolvimento de bactérias. O meio WLD foi muito revelador ao apresentar um desenvolvimento confluyente, que após teste de confirmação verificou-se tratarem-se de colónias de bactérias acéticas. Assim e tal como na sub-amostra AI, concluiu-se que as leveduras presentes seriam *Saccharomyces*, e que o seu desenvolvimento não foi possível neste meio de cultura devido á presença de actidiona. O meio DBDM, revelou resultados negativos os quais reforçam os resultados do anterior meio de cultura.

O vinho da amostra B, em meio CRB revelou desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos. Tal como nas anteriores sub-amostras AI e AII, este desenvolvimento confluyente de leveduras suscita algumas dúvidas quanto às estirpes de leveduras envolvidas, sendo os resultados obtidos nos restantes meios de cultura, primordiais para se efectuar um despiste efectivo do que está a ocorrer. Em meio WLN, esta amostra revelou desenvolvimento de bactérias. Em meio WLD, verificou-se desenvolvimento microbiano confluyente o qual, à partida, e tendo em conta os resultados do meio WLN seriam bactérias, no entanto submeteu-se a teste de confirmação em meio de etanol, o qual se revelou positivo, confirmando assim tratarem-se de bactérias acéticas. O meio DBDM, não revelou resultados positivos.

O vinho da amostra C, não apresentou resultados diferentes do anterior ensaio, apresentando-se com um índice de estabilidade microbiológica elevado.

O Quadro 12, retrata os resultados em meio de etanol para este ensaio.

QUADRO 12 – CONFIRMAÇÃO DE RESULTADOS DO ENSAIO 5.

Amostra	MEIOS DE CULTURA
	PLACA EM MEIO DE ETANOL
AI	Positivo
AII	Positivo
B	Positivo
C	Positivo

Feita a confirmação em meio de etanol, verificou-se que em todas as amostras as colónias eram de bactérias acéticas.

ENSAIO 6

Este ensaio decorreu em Junho, tendo a temperatura ambiente aumentado. O aumento da temperatura é importante para o desenvolvimento microbiano, o que nesta fase se torna importante avaliar.

As amostras permaneceram nas mesmas condições, não havendo nenhuma alteração a registar.

Uma vez que os vinhos nesta fase encontravam-se em estabilização já há algum tempo, alterou-se a técnica microbiológica, abandonando assim a técnica de espalhamento à superfície para a técnica de filtração em membrana. Uma vez que esta técnica concentra a amostra ao efectuar a filtração, aumentamos a probabilidade de ocorrência de desenvolvimento de microrganismos, o que para a avaliação dos ensaios é de extrema importância.

QUADRO 13 – RESULTADOS DO ENSAIO 6.

Junho 2010	MEIOS DE CULTURA			
Amostra	CRB	WLN	WLD	DBDM
AI	Fungos Filamentosos: 6,4 x 10 ³ u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: Incontável	Fungos Filamentosos: 1,2 x 10 ² u.f.c/mL Leveduras: <1 u.f.c/mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Negativo
AII	Fungos Filamentosos: 1,7 x 10 ² u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: Incontável	Fungos Filamentosos: 7,3 x 10 ² u.f.c/mL Leveduras: <1 u.f.c/mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Negativo
B	Fungos filamentosos: 6 x 10 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: Incontável	Fungos filamentosos: 8,2 x 10 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Negativo
C	Fungos Filamentosos: Incontável	Fungos Filamentosos: 5,7 x 10 ² u.f.c/ mL Leveduras: 2,8 x 10 u.f.c/ mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: 1,7 x 10 u.f.c/ mL Leveduras: <1 u.f.c/mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Negativo

CRB – Rose Bengal Chloranphenicol Agar; WLN – Wallerstein Laboratory Nutrient; WLD – Wallerstein Laboratory Differential; DBDM - Dekkera Brettanomyces Differential Médium.

Neste ensaio todas as placas apresentaram um crescimento confluyente de fungos filamentosos, de tal forma que impediu a sua contagem e avaliação para a grande maioria das placas. Verificou-se também algum desenvolvimento de leveduras, no entanto os fungos tapavam quase a totalidade das placas, limitando a sua avaliação.

Este ensaio revelou-se inconclusivo, não permitindo a sua correcta avaliação.

Perante estes resultados, tentou-se avaliar quais as causas para que tal situação tivesse ocorrido, e tentou-se perceber o que poderia estar na causa do desenvolvimento confluyente de fungos, facto que até então não tinha acontecido. Todo o processo foi reavaliado, desde a avaliação das amostras (se tinha havido algo que justificasse tal situação), a forma da colheita das amostras, o material utilizado na colheita das amostras, a esterilização dos meios de cultura e todas as condições de assépsia.

Descartadas as hipóteses de contaminações cruzadas hipoteticamente causadas pelo material, surgiu a hipótese de se tratarem de fungos com origem ambiental, uma vez que a sala das barricas tem uma temperatura ambiente não superior a 15° C, e a humidade relativa do ar é elevada, sendo condições propícias ao desenvolvimento deste fungos.

Desta forma, verificaram-se todos os procedimentos que estavam a ser utilizados para a colheita das amostras, e verificou-se que: até então as seringas eram retiradas da solução de higienização e enxaguadas abundantemente nas instalações da adega ficando desencaixadas no balde do material limpo, sendo transportadas desta forma para a sala das barricas e só na sala das barricas é que eram inseridos os seus êmbolos.

Uma vez que se suspeitava que estes fungos eram de origem ambiental, alterou-se esta prática para que os êmbolos fossem introduzidos nas seringas, assim que estas fossem retiradas da solução de higienização, ainda nas instalações da adega. Assim, as seringas iam fechadas já para a sala das barricas, de forma a minimizar a contaminação do interior das mesmas.

Para se avaliar de que forma a solução de higienização das seringas estava a ser eficaz, delineou-se efectuar uma avaliação do estado microbiológico das mesmas, assim que fossem retiradas da solução de higienização, assim como em seringas após a colheita das amostras.

Nesta fase, para que não surgissem mais situações menos esclarecedoras, verificou-se ser bastante importante avaliar a esterilização dos meios de cultura, para que não restasse qualquer dúvida em relação a isso. Assim, delineou-se que no próximo ensaio fossem colocadas placas dos meios CRB, WLN e WLD na estufa de incubação, para desta forma se avaliar a sua esterilidade.

Quanto à rampa de filtração, também a eficácia da sua esterilização foi posta em causa nesta altura. Para que esta hipótese fosse descartada, delineou-se que no próximo ensaio fossem efectuados vários controlos de brancos.

ENSAIO 7

Este ensaio decorreu em Julho, e teve algumas alterações em relação aos ensaios anteriores.

As amostras permaneceram nas mesmas condições, no entanto e tal como já foi referido anteriormente, o tratamento do material de amostragem foi efectuado de forma diferente.

A técnica microbiológica seguida foi a técnica de filtração.

Este ensaio revelou-se de extrema importância, pois de uma forma linear efectuou-se uma avaliação do estado de esterilização da rampa de filtração, dos meios de cultura, das seringas após higienização e posteriormente à colheita das amostras.

QUADRO 14 – RESULTADOS DO ENSAIO 7.

Julho 2010	MEIOS DE CULTURA			
Amostra	CRB	WLN	WLD	DBDM
AI	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/mL Leveduras: 1,4 x 10 u.f.c/ mL	Leveduras: Incontável	Fungos Filamentosos: 1 u.f.c/mL Leveduras: 4,5 x 10 u.f.c/mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Negativo
AII	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c /mL Leveduras: 6 x 10 ² u.f.c/ mL	Leveduras: Incontável	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c /mL Leveduras: 2 x 10 ² u.f.c/ mL Bactérias:<1 u.f.c/mL	Negativo
B	Fungos Filamentosos: 4 x 10 ² u.f.c/ mL Leveduras: 1 x 10 u.f.c/ mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c /mL Leveduras: 7,7 x 10 u.f.c/ mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: 2 x 10 ² u.f.c/ mL Leveduras: 3,9 x 10 u.f.c/ mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Negativo
C	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/mL Leveduras: 1 x 10 u.f.c/ mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/mL Leveduras: 2 x 10 ² u.f.c/ mL Bactérias: <1 u.f.c/mL	Fungos Filamentosos: <1 u.f.c/mL Leveduras: <1 u.f.c/ mL Bactérias: 1 x 10 u.f.c/ mL	Negativo
Branco AI	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	-----
Branco B	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	-----
Branco D	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	-----
Placas de branco	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	-----
Seringas usadas	Incontável	Incontável	Incontável	-----
Seringas após higienização	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	-----

CRB – Rose Bengal Chloranphenicol Agar; WLN – Wallerstein Laboratory Nutrient; WLD – Wallerstein Laboratory Differential; DBDM - Dekkera Brettanomyces Differential Médium.

O controlo de brancos foi efectuado entre a filtração das amostras. Todos os brancos revelaram-se sem desenvolvimento microbiano. Este resultado foi bastante importante e positivo, pois assegurou que os procedimentos de esterilização até então eram bem conseguidos e eficazes. Com base nesta avaliação descarta-se a hipótese de algum tipo de contaminação cruzada das amostras durante a sua filtração.

As amostras das seringas após higienização, não revelaram desenvolvimento de leveduras e bactérias, o que é um bom resultado pois a solução de higienização visa a eliminação destes microrganismos para desta forma não se estar perante um foco de contaminação cruzada.

As amostras das seringas usadas, apresentaram um crescimento confluyente de fungos filamentosos, não permitindo a avaliação das mesmas.

As placas de brancos, não revelaram qualquer tipo de desenvolvimento microbiano. Estes dados reforçam a garantia de esterilização dos meios de cultura que foram utilizados durante os ensaios.

Quanto aos vinhos das amostras, na generalidade, com esta alteração do modo de preparação do material de colheita de amostras, verificou-se uma diminuição das contaminações das amostras por fungos de origem ambiental.

O vinho da sub-amostra AI, em meio CRB revelou algum desenvolvimento de leveduras, salientando-se uma diminuição do desenvolvimento em relação aos ensaios anteriores. Em meio WLN esta sub-amostra apresentou desenvolvimento confluyente de leveduras. Este desenvolvimento confluyente e tendo em conta que estas amostras foram colhidas em Julho (época de aumento da temperatura ambiente), terá que ser avaliado em conjunto com os resultados obtidos em meio WLD, para assim se tentar perceber que tipo de leveduras poderão estar na sub-amostra.

Tal como já foi referido anteriormente, restava saber que tipo de leveduras seria, e para ajudar a retirar mais conclusões efectuou-se a análise dos resultados do meio WLD, tendo em conta que este meio de cultura, devido à presença de actidiona, inibe o desenvolvimento de *Saccharomyces* favorecendo o desenvolvimento de bactérias acéticas e lácticas. Assim e com base na avaliação das placas, verificou-se que existe desenvolvimento de leveduras, o que com base no anteriormente citado não se trata de *Saccharomyces*, podendo assim ser outro tipo de levedura.

Para descartar a hipótese de se tratar de leveduras de alteração o meio DBDM, específico para este tipo de leveduras revelou resultado negativo, descartando assim esta hipótese.

O vinho da sub-amostra AII, em meio CRB revelou algum desenvolvimento de leveduras. Tal como na sub-amostra AI, em meio WLN, verificou-se desenvolvimento confluyente de leveduras e a sua avaliação foi efectuada da mesma forma. Para descartar a hipótese de se tratar de leveduras de alteração o meio DBDM, específico para este tipo de leveduras revelou resultado negativo, descartando assim esta hipótese.

O vinho da amostra B, em meio CRB revelou desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos. Tal como nas anteriores sub-amostras AI e AII, este desenvolvimento de leveduras suscita algumas dúvidas quanto às estirpes de leveduras envolvidas, sendo os resultados obtidos nos restantes meios de cultura, primordiais para se efectuar um despiste efectivo do que está a ocorrer. O meio WLN ao privilegiar o desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos, também permite o desenvolvimento de bactérias acéticas e lácticas, desta forma verifica-se que neste meio de cultura esta amostra revelou desenvolvimento de leveduras. Para confirmar que tipo de leveduras estariam presentes na amostra os restantes meios de cultura envolvidos no ensaio foram determinantes para a sua confirmação. Em meio WLD, verificou-se o desenvolvimento de fungos filamentosos, mas também de leveduras. Tendo em conta que este meio inibe o desenvolvimento de *Saccharomyces*, suscitou algumas dúvidas sobre a estirpe de leveduras presente na amostra. Para despistar a hipótese de se tratarem de leveduras de alteração, o meio de cultura DBDM, específico para este tipo de leveduras, revelou resultados negativos.

O vinho da amostra C, revelou-se mais uma vez de elevada estabilidade microbiológica em todos os meios de cultura envolvidos nos ensaios.

Este ensaio foi extremamente importante pois fiabiliza os resultados anteriores, no que diz respeito às condições de assépsia, assim como de esterilidade. Para além disso garante que a alteração da forma de manuseamento das seringas para a colheita das amostras, minimizou as contaminações de origem ambiental.

RESULTADOS DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS CEDIDAS PELA QUINTA DO MONTE D'OIRO

Ao longo do decorrer dos ensaios anteriores, que foram efectuados no laboratório de microbiologia da ESAS, amostras oriundas dos mesmos vinhos foram submetidas a análises cromatográficas no laboratório do ISA, para controlo da levedura do género *Dekkera/Brettanomyces*.

De acordo com a bibliografia citada, algumas leveduras de alteração manifestam-se pela produção de fenóis voláteis, muitas vezes em valores não detectados pelo nariz humano. Desta forma os valores das análises cromatográficas, ajudam a efectuar correlações entre estes resultados e os resultados das análises microbiológicas.

-AMOSTRA A1

**QUADRO 15 – RESULTADOS DOS ENSAIOS EFECTUADOS NO ISA,
AMOSTRA A1**

DATA DOS ENSAIOS	DATA DE TRASFEGA	BARRICA NOVA	MEIO DBDM
		VALORES DE 4-ETIL-FENOL	
23-3-2010	-----	Não detectado	-----
-----	24-3-2010	-----	-----
10-8-2010	-----	176 ppb	<1 ufc/50 mL Não apresentava cheiro a 1; 10 e 100 mL de amostra filtrada

Este vinho encontrava-se em barricas novas, o que de acordo com a bibliografia citada minimizava a ocorrência de desenvolvimento microbiano. Antes de efectuar a trasfega deste vinho, foi colhida uma amostra do mesmo e submetida a análise cromatográfica, a qual não revelou qualquer valor de 4-etil-fenol.

Durante os meses de verão registaram-se temperaturas bastante elevadas, e com valores de humidade relativa muitos baixos. De acordo com a bibliografia citada, as elevadas temperaturas propiciam o desenvolvimento de leveduras de alteração nos vinhos, o que no caso destas leveduras estarem presentes nas amostras destes vinhos, durante estes meses a sua proliferação é mais notória, e os seus efeitos mais evidentes. Desta forma, no mês de Agosto o vinho desta amostra foi submetido a análise cromatográfica, e verificou-se que já apresentava 176 ppb de 4-etil-fenol. Trata-se de um valor abaixo do limiar de detecção destes compostos voláteis, e assim não é detectado pelo nariz humano.

Comparando estes resultados com os obtidos nas análises microbiológicas, verifica-se que os vários ensaios que envolveram esta amostra de vinho, não apresentaram desenvolvimento de leveduras de alteração em meio específico para o seu desenvolvimento, no entanto, no mês de Agosto por análise cromatográfica detectaram-se valores de 4-etil-fenol. Não se pode deixar de referir que no último ensaio que envolveu este vinho, no mês de Julho, em meio WLD verificou-se desenvolvimento de leveduras, o que poderia indiciar que estas se tratassem de leveduras de alteração, o que não se confirmou em meio DBDM específico para leveduras de alteração, em que os resultados foram negativos, não havendo produção de cheiro característico. Os resultados obtidos para esta amostra, tanto microbiológicos como cromatográficos, permitem reflectir que, caso os ensaios microbiológicos tivessem continuidade, poder-se-ia vir a detectar a presença de leveduras de alteração, apesar de, e de acordo com a bibliografia citada, este facto ser pouco provável em vinhos armazenados em barricas novas.

-AMOSTRA AII

**QUADRO 16 – RESULTADOS DOS ENSAIOS EFECTUADOS NO ISA,
AMOSTRA AII**

DATA DOS ENSAIOS	DATA DE TRASFEGA	VALORES DE 4- ETIL-FENOL	MEIO DBDM
23-3-2010	-----	7 ppb	
-----	24-3-2010	-----	-----
10-8-2010		92 ppb	<1 ufc/50 mL Não apresentava cheiro a 1; 10 e 100 mL de amostra filtrada

Este vinho, estagiou em barricas usadas, e pertencia à mesma matriz do vinho da anterior. De facto o que diferenciou estas duas amostras foi o facto de serem divididos por barricas novas e por barricas usadas, com a finalidade de avaliar a sua evolução. Ao efectuar a análise cromatográfica, antes das trasfegas, a esta amostra de vinho, estas revelaram 7 ppb de 4-etil-fenol. Este valor para além de ser reduzido e imperceptível, mereceu toda a atenção pois poderia indiciar um foco de desenvolvimento de leveduras de alteração, no entanto as análises microbiológicas em meio DBDM, não o evidenciaram. Em Agosto, verificou-se um aumento dos valores de 4-etil-fenol, no entanto ainda abaixo do limite de detecção.

Os resultados para o vinho desta amostra em confronto com os resultados da amostra AI, revelaram-se interessantes. De facto, ambos os vinhos são oriundos da mesma amostra, mas o facto de terem estado a estagiar em barricas novas e em barricas usadas, revelou resultados diferentes.

De acordo com a bibliografia citada anteriormente, as barricas novas assegurariam uma maior estabilidade ao vinho pois a porosidade da madeira não tinha quaisquer focos de contaminação que pudessem ser um foco de contaminação cruzada, para além de a própria barrica não ter tido contacto com vinhos anteriormente. O aumento dos valores de 4-etil-fenol que é evidenciado por análise cromatográfica em Agosto, reflecte o que anteriormente foi citado na bibliografia, em que é referido que as elevadas temperaturas propiciam o desenvolvimento de leveduras de alteração nos vinhos.

No caso destas leveduras estarem presentes nos vinhos, durante estes meses a sua proliferação é mais notória, e os seus efeitos mais evidentes. Para além de 92 ppb de 4-etil-fenol ser um valor abaixo do limite de percepção (426 ppb) para o nariz humano, as análises reflectem um aumento dos valores de 4-etil-fenol ao longo do ensaio.

Ao comparar os resultados da Amostra AII com a amostra AI, verifica-se que contrariamente ao que seria expectável, os resultados da Amostra AII (barrica usada) foram inferiores aos da Amostra AI (barrica nova). Assim verifica-se que os resultados obtidos não corroboram a tese da diferença entre os vinhos das barricas novas e usadas.

-AMOSTRA B**QUADRO 17 – RESULTADOS DOS ENSAIOS EFECTUADOS NO ISA,
AMOSTRA B**

DATA DOS ENSAIOS	DATA DE TRASFEGA	VALORES DE 4- ETIL-FENOL	MEIO DBDM
4 – 2 – 2010	-----	389 ppb;	19 u.f.c/10 mL
-----	11-2-2010	-----	-----
23 – 3 - 2010	-----	32 ppb	-----
10 – 8 - 2010		117 ppb	<1 ufc/50 mL Não apresentava cheiro a 1; 10 e 100 mL de amostra filtrada

A análise cromatográfica a esta amostra de vinho, inicialmente revelou um elevado valor de 4-etil-fenol, sendo este perto do limite de percepção pelo nariz humano. Em meio específico para leveduras de alteração, DBDM, este revelou algum desenvolvimento de leveduras de alteração. O facto deste desenvolvimento de leveduras de alteração não ter sido revelado nas análises microbiológicas no laboratório da ESAS, poderá ter a ver com estas terem sido efectuadas antes desta data o que indicia que o desenvolvimento ainda não se tinha verificado.

Em Março, as análises demonstram uma diminuição dos valores de 4-etil-fenol, para valores francamente aceitáveis e seguros, o que indica que na análise anterior houve erro, e que se espera a vir a confirmar no ensaio seguinte.

Em Agosto tal como era expectável, os valores além de serem ligeiramente superiores aos da análise anterior, são inferiores ao da primeira análise, o que comprova que houve realmente algum erro nessa análise.

Este vinho, tal como foi anteriormente referido, efectuou o seu estágio unicamente em barricas usadas que sofreram tratamento e higienização de forma a serem seguras para serem novamente utilizadas.

No entanto, e de acordo com a bibliografia citada, o facto das barricas serem usadas, já tiveram no seu interior outros vinhos, o que faz com que os canais e poros da madeira possam ter ficado com alguns pequenos resíduos, mesmo após a higienização. Estes poros ou canais além de ficarem com resíduos, podem servir de alojamento a microrganismos. Desta forma, as barricas ao serem cheias com vinho novamente, estes canais ou poros também serão cheios, e com o evoluir do tempo as contaminações podem vir a acontecer. No entanto, os resultados obtidos durante a realização dos ensaios não confirmam esta tese, pois não se detectaram leveduras de alteração nem valores elevados de 4-etil-fenol para os vinhos nestas condições.

- AMOSTRA C

**QUADRO 18 – RESULTADOS DOS ENSAIOS EFECTUADOS NO ISA,
AMOSTRA C**

DATA DOS ENSAIOS	DATA DE TRASFEGA	VALORES DE 4 -ETIL-FENOL	MEIO DBDM
4 – 2 – 2010	-----	218 ppb;	19 u.f.c./10 mL
-----	12-11-2010	-----	-----
23 – 3 - 2010	-----	220 ppb	-----
10 – 8 - 2010		300 ppb	<1 ufc/40 mL. Não apresentava cheiro a 1; 10 e 100 mL de amostra filtrada

Este vinho permaneceu todo o tempo em que decorreram os ensaios, em cuba de inox. As análises cromatográficas demonstram que em Fevereiro este vinho evidenciava a presença de valores de 4-etil-fenol, no entanto abaixo do limite de detecção. Os valores de 4-etil-fenol foram aumentando ligeiramente até Agosto, ficando ainda abaixo do limite de percepção pelo nariz humano, 426 ppb. Confrontando estes resultados com os obtidos no laboratório da ESAS, durante um período mais alongado, verifica-se que existe correlação entre as análises, pois este vinho em relação às outras amostras apresenta-se com maior estabilidade. Além de se verificar a presença de valores de 4-etil-fenol, estes não têm uma oscilação tão marcante como nas amostras anteriores.

CAPITULO VI – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6.1. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A apreciação global das análises efectuadas sugere que o vinho que apresenta uma maior estabilidade microbiológica é o vinho da Amostra C, que permaneceu durante o decorrer dos ensaios, em cuba de inox. Os resultados dos ensaios deste vinho, apresentaram valores estáveis, sem grande evolução em termos de microflora, que manifestamente demonstram que o vinho armazenado em cuba de inox tem uma estabilidade maior, em relação a outras vasilhas. Verificou-se que o facto de se alterar a forma de amostragem, foi preponderante para se detectar valores de 4-etil-fenol nas análises cromatográficas realizadas no laboratório do ISA.

O vinho que permaneceu em barrica nova, não apresentou valores com grandes oscilações em relação aos vinhos que permaneceram em barricas usadas, verificando-se populações microbianas na mesma ordem de grandeza. Esta situação foi de grande importância uma vez que o expectável era a situação contrária. Durante o desenrolar dos ensaios, os resultados obtidos não evidenciam que as barricas usadas potenciem o desenvolvimento de leveduras de alteração face às barricas novas.

O modo de colheita das amostras e a sua alteração permitiram minimizar o impacto das contaminações ambientais a que as amostras estavam a ser sujeitas na altura da sua recolha. Minimizando estes aspectos foi possível consolidar todo o modo de amostragem assim como as condições de assépsia em que as análises estavam a ser realizadas, conferindo-lhes fiabilidade.

Os ensaios microbiológicos efectuados no laboratório da ESAS terminaram em Julho, no entanto os restantes meses de verão foram bastante quentes e com valores de humidade relativa bastante baixos.

Perante estas condições perspectiva-se que caso as leveduras de alteração estivessem presentes nas amostras pudessem vir a desenvolver-se nos meses de maior calor, o que se verifica nas análises cromatográficas realizadas no ISA no mês de Agosto, em que se detectou valores de 4-etil-fenol superiores.

Perspectiva-se que perante estas condições o vinho da Amostra C, seria o que continuaria a apresentar uma maior estabilidade microbiológica, relativamente às restantes amostras.

BIBLIOGRAFIA

- ✓ Alexandre, H., P.J. Costello, F. Remize, J. Guzzo, and M. Guilloux-Benatier (2004). *Saccharomyces cerevisiae*—*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 93: 141–154.
- ✓ Aguilar Uscanga, M.G., Delia M.-L., Strehaiano, P (2003) – *Brettanomyces bruxellensis*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 61: 157 – 162.
- ✓ Fugelsang, K; Edwards, C. (2010) - *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedure*; Second edition; Springer.
- ✓ Gonçalves, G (1996) – Leveduras do género *Dekkera*/ *Brettanomyces*: Métodos de despiste rápido e sua incidência em vinhos portugueses. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- ✓ Guira, J. (2010) – *Vinhos da Estremadura*, Enciclopédia dos Vinhos de Portugal, v 8, Edições Chaves Ferreira.
- ✓ Loureiro, V.; Barata, A; Pagliara, D; Piccinino, T; Tarantino, F; Ciardulli, W; Malfeito-Ferreira, M.; (2008) – *The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by Dekkera bruxellensis in wine*. *Federation of European Microbiological Societies.* 1097-1102.
- ✓ Loureiro, V.; Barata, A; Pagliara, D; Caldeira, J; Botelho, R; Malfeito-Ferreira, M.; (2007) – *Survival patterns of Dekkera bruxellensis in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide*. *International Journal of Food Microbiology.* 201-20.
- ✓ Loureiro, V.; Malfeito-Ferreira, M. (2003) – *Spoilage Yeasts in the Wine Industry*. *Int. J. Food Microbiol.* 86:23-50.
- ✓ Loureiro, V.; Malfeito-Ferreira, M. (2009) – *Wine Spoilage by Fungal Metabolites*. *Wine Chemistry and Biochemistry.* 626-635.
- ✓ Peynaud, E (1981) – *Conhecer e trabalhar o vinho*; Editorial Presença.
- ✓ Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donéche, and A. Lonvaud. 2000. *Handbook of Enology. Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- ✓ Silva, G (2005) – *Dekkera e Brettanomyces: leveduras não competitivas que deterioram vinhos*. Embrapa.

MEDIAGRAFIA

- ✓ www.infovini.com, consultado dia 10 de Julho de 2010
- ✓ www.winexperts.terra.com.br, consultado dia 11 de Julho de 2010
- ✓ www.en.wikipedia.org/wiki/Syrah, consultado no dia 11 de Julho de 2010
- ✓ www.prazeresrequintados.blogspot.com/2010/01casta-syrah.html, consultado no dia 11 de Julho de 2010
- ✓ www.viaderlab.com, consultado a 10 de Agosto de 2010
- ✓ www.mariajoaodealmeida.clix.pt, consultado a 10 de Agosto de 2010
- ✓ www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/vinho/enologia3.html, consultado a 10 de Agosto de 2010
- ✓ www.quintadomontedoiro.com, consultado a 3 de Outubro de 2010
- ✓ www.Ivv.Min-Agricultura.pt, consultado a 3 de Outubro de 2010
- ✓ www.eufic.org, consultado a 3 de Outubro de 2010
- ✓ www.icb.ufmg.br, consultado a 3 de Outubro de 2010