View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by UTL Repository

Vinificação de uvas afectadas por podridão ácida

Alda Sofia Aires Rebelo Monteiro Pais

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar

Orientador: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira

Juri

Presidente: Doutor Virgílio Borges Loureiro

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira

Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Lisboa, 2010

“*Sê humilde*

Se queres adquirir sabedoria,

Sê ainda mais humilde ainda,

Quando a tiveres adquirido”

Helena P.Blavatsky

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao fim desta etapa, gostaria muito de começar por agradecer a todos os quantos me acompanharam: professores, colegas, amigos, família e tantas outras pessoas que comigo se cruzaram e que de forma mais ou menos directa, me foram proporcionando experiências que contribuíram para o meu enriquecimento académico e pessoal.

Ao Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira, pela sua orientação conselhos, ensinamentos, pelo seu enorme apoio, incentivo, boa disposição e paciência.

Ao Professor Doutor Virgílio Borges Loureiro, por me ter aceitado neste trabalho, pelos seus conselhos e ainda por me ter motivado enquanto docente de Microbiologia Enológica, no Instituto Superior de Agronomia, por estas matérias.

Ao engenheiro Óscar Gato da Adega Cooperativa de Borba.

Ao André Barata, pela sua colaboração diária, incentivo e amizade demonstrada, bem como à D. Maria Júlia pelas análises realizadas no Laboratório Ferreira Lapa do Instituto Superior de Agronómia.

A todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia Carla, Paula, António, Rute, pela disponibilidade, ajuda, paciência boa disposição, à D. Manuela, à D. Lena e a Isabel, pela simpatia, bom humor e ajuda, que todos os dias demonstraram.

Às minhas colegas de curso, especialmente a Catarina Fonseca, Marisa Bairrinhas, Joana Rodrigues e Soraia Freire, por todo o apoio, pela amizade demonstrada e pelos bons momentos passados ao longo do curso.

Aos meus amigos, especialmente à Cristina Gomes, Ana Santos e ao Sérgio por terem estado sempre presentes, pela paciência, pelo incentivo, pela motivação sempre demonstrada pela amizade e pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Aos meus Pais e Avós, que sempre estiveram do meu lado, incentivando-me nas minhas escolhas, que tudo fizeram para que este sonho se concretizasse motivando-me tanto nos momentos difíceis como nos bons, por todo o amor, carinho compreensão, conhecimento, educação e valores presenteados ao longo da vida.

A todos aqueles que mesmo não mencionados, contribuíram para a realização deste trabalho

A todos o meu, Muito Obrigado

ÍNDICE

ÍNDICE…… i
ÍNDICE DE FIGURAS…… iii
ÍNDICE DE TABELAS…… iv

RESUMO…… v
ABSTRACT…… vi
EXTENDED ABSTRACT…… vii

1. INTRODUÇÃO…… 1
1.1. Qualidade da uva…… 1
1.2. Doenças e pragas da videira…… 1
1.3. Ecologia Microbiana das Uvas…… 2
1.4. Podridão Cinzenta versus Podridão Ácida…… 3
1.5. Podridão cinzenta…… 4
1.5.1. Biologia e epidemiologia…… 4
1.5.2. Sintomatologia…… 5
1.5.3. Alteração da composição química dos vinhos…… 6
1.5.4. Relação entre traça da uva e podridão cinzenta…… 7
1.6. Podridão ácida…… 8
1.6.1. Etiologia…… 8
1.6.1.1 Condições favoráveis ao desenvolvimento da doença…… 8
1.6.1.2. Microrganismos envolvidos na podridão ácida…… 10
1.6.1.3 Insectos- Vectores…… 13
1.6.2. Sintomatologia…… 15
1.6.3. Alteração da composição química dos vinhos…… 17
1.7. Estratégias de protecção…… 20
1.7.1. Estimativa do risco e tomada de decisão…… 20
1.7.2. Meios de protecção…… 21
1.8. Enquadramento e objectivos do trabalho…… 23
2. MATERIAL E MÉTODOS…… 25
2.1. Vindima…… 25
2.1.1. Controlo de maturação…… 25
2.2. Microvinificações de uvas com podridão ácida…… 25
2.2.1. Vinificações…… 26

2.2.2. Levedura de fermentação inoculada……..…… 26
2.2.3. Preparação do inóculo…….. 26
2.2.4. Fermentação dos mostos……. 27
2.2.5. Fim de fermentação……... 28
2.2.6. Fermentação maloláctica…….. 28
2.3. Determinações analíticas……. 28
2.4. Análises microbiológicas…….. 29
2.4.1. Meios de cultura utilizados……... 29
2.4.2. Quantificação dos microrganismos após a F.M.L…… 30
2.4.3. Quantificação dos microrganismos após 6 meses de estágio em garrafa……... 31
2.4.4. Isolamento e purificação da flora de leveduras após F.M.L e estágio em garrafa. 31
2.4.5. Identificação dos isolados de leveduras obtidas nas análises microbiológicas….. 32
2.5. Análise Sensorial…… 32
2.5.1. Análise sensorial antes da FML…….. 32
2.5.2. Análise sensorial após seis meses de estágio……. 32
3. Resultados e Discussão……... 33
3.1. Controlo de maturação……. 33
3.2. Rendimentos de vindima…….. 33
3.3. Fermentações Vinárias……. 34
3.4. Análises químicas……... 35
3.4.1. Análise química ao mosto…… 35
3.4.2. Análise química ao vinho após Fermentação alcoólica…….. 37
3.4.3. Análise química ao vinho após 6 meses de estágio…… 39
3.5. Análise microbiológica dos vinhos…….. 40
3.5.1. Espécies de leveduras isoladas nas diferentes modalidades…… 42
3.5.2. Quantificação de bactérias acéticas e lácticas……. 43
3.6. Análise Sensorial dos Vinhos no fim da fermentação alcoólica……. 44
3.7. Análise Sensorial dos Vinhos após 6 meses em estágio de garrafa…… 45
3.7.1. Características aromáticas dos vinhos…….. 46
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS……. 48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS…… 50

ANEXO I……... 58
ANEXO II..……... 61
ANEXO III……... 63
ANEXO IV……... 65

ANEXO V..... 67
ANEXO VI..... 74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Cacho afectado por podridão cinzenta (Gomes, 2006)…… 6
Figura 2 – Cacho completamente destruído por *Botrytis cinerea* (Coutinho, 2002)…….. 6
Figura 3 – Condições favoráveis ao desenvolvimento da podridão ácida…… 10
Figura 4 – Sintomas de podridão ácida num cacho da casta Chardonnay, na vinha da Região da Bairrada (Gomes, 2004)……..……. 17
Figura 5 – Sintomas de podridão ácida num cacho da casta Trincadeira Preta, na vinha do Instituto Superior de Agronomia, Vindima de 2008……. 17
Figura 6 – Bagos esvaziados do seu conteúdo e a presença de *Drosophila* sp. na superfície da película, na vinha Instituto Superior de Agronomia, Vindima de 2008…… 17
Figura 7 – Esquema dos ensaios de microvinificação realizados nas vindimas…….. 26
Figura 8 – Evolução da massa volúmica, temperatura e acidez volátil dos mostos das modalidades T0, T30 e T50……... 34
Figura 9 – Evolução da massa volúmica, temperatura e acidez volátil dos mostos das modalidades CT0 e CT30……..……. 35
Figura 10 – Características aromáticas das 5 modalidades em estudo…… 46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Inimigos – chave e inimigos ocasionais da vinha. Adaptado (Amaro, 2004)… 2
Tabela 2 – Principais espécies de leveduras isoladas em uvas afectadas por podridão ácida comparativamente com uvas sãs (Barata *et al.*, 2008a)……..…….. 12
Tabela 3 – Comparação de mostos de vinhos da casta Riesling na Vergínia (Zoecklein, 2000a)……..…… 19
Tabela 4 – Incidência química de diversas podridões no mosto/uva.…… 20
Tabela 5 – Percentagens e variedade de uvas utilizadas nos 5 ensaios de microvinificação realizados durante a vindima de 2008……..…...…. 25
Tabela 6 – Controlo de maturação da casta Trincadeira Preta e Cabernet Sauvignon…. 33
Tabela 7 – Rendimento da vindima de 2008……...….. 33
Tabela 8 – Análises convencionais e por FTIR dos mostos das modalidades realizadas na vindima de 2008……..…. 36
Tabela 9 – Análise por FTIR e convencional dos vinhos finais após a fermentação alcoólica……...……. 37
Tabela 10 – Análise por FTIR dos vinhos finais após a FML…….. 38
Tabela 11 – Análise química por FTIR e convencional dos vinhos após 6 meses de estágio…….. 40
Tabela 12 – Contagem de leveduras totais em meio GYP, leveduras de alteração crescidas em meio específico e diferencial DBDM específico para Dekkera/Brettonomyces e ZDM específico para Zygosaccharomyces presentes nas modalidades estudadas no fim da F.M.L e após 6 meses de estágio em garrafa……..... 41
Tabela 13 – Quantificação da flora de leveduras presentes nas 5 modalidades testadas após a F.M.L e 6 meses de estágio……..... 42
Tabela 14 – Quantificação de bactérias lácticas e acéticas presentes nos vinhos analisados, após FML e estágio de 6 meses, utilizando a técnica do N.M.P.. 43
Tabela 15 – Avaliação organoléptica dos vinhos obtidos a partir de uvas sãs e com podridão ácida após fermentação alcoólica.…… 44
Tabela 16 – Efeito da adição de uvas com podridão ácida nas características organolépticas dos vinhos produzidos seis meses de estágio em garrafa….. 45
Tabela 17 – Frequência de detecção dos descritores aromáticos indicados pelos 15 provadores (frequência máxima = 15), referentes aos 5 vinhos após 6 meses de estágio em garrafa……..…. 46

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se a utilização de uvas com podridão ácida na fermentação vinária e consequente qualidade final do vinho. Foram realizadas microvinificações de uvas tintas sãs de Trincadeira Preta e Cabernet Sauvignon, adicionadas de uvas podres. Os mostos e os vinhos, correspondentes a 30 e 50% (p/p) de uvas podres, apresentaram um aumento nos parâmetros intensidade de cor, antocianas totais e fenóis totais em função da proporção de uvas podres. Este aumento também se reflectiu numa maior concentração de açúcar dos mostos e, por conseguinte, num aumento do grau alcoólico dos vinhos obtidos. A acidez volátil mais elevada nos vinhos feitos com uvas podres foi devida ao seu teor inicial mais elevado nos mostos. Foi possível estabilizar microbiologicamente os vinhos com podridão ácida de forma a não apresentarem microrganismos potencialmente perigosos, embora possuíssem teores mais elevados de açúcares residuais. Os resultados da análise sensorial, por um painel não treinado, antes da fermentação maloláctica e após seis meses de estágio, demonstraram não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tipos de vinhos.

Em conclusão, foi possível vinificar uvas com elevados níveis de podridão ácida sem que a qualidade dos vinhos fosse afectada de forma perceptível pelo painel de prova.

PALAVRAS-CHAVE: Podridão ácida, qualidade do vinho, fermentação vinária, análise sensorial, leveduras de contaminação.

ABSTRACT

In this study we evaluated the use of grapes with sour rot on the wine fermentation and the consequent final quality of wine. For that, microvinification of healthy grapes belonging to the variety of Trincadeira Preta and Cabernet Sauvignon were performed to which were added grapes affected by sour rot. The musts and wines, corresponding to 30 and 50% (w/w) of rotten grapes, showed an increase in the parameters color intensity, total anthocyanins and total phenols in function to the proportion of rotten grapes. This increase also reflected in a higher sugar concentration of grape must and therefore an increase in the alcohol content of wines produced. The higher volatile acidity in wines made from rotten grapes was due to its higher initial content in musts. It was possible to stabilize microbiologically wines with sour rot in order to avoid introducing potentially harmful microorganisms, although they possessed higher levels of residual sugars. The results of sensory evaluation by an untrained panel, before malolactic fermentation and after six months of probation, showed no statistically significant differences exist between different types of wines.

In conclusion, it was possible to vinify grapes with high levels of sour rot without the quality of the wines being distinctly affected by the tasting panel.

KEY WORDS: Sour rots, wine quality, alcoholic fermentation, sensorial analysis, yeast contamination.

EXTENDED ABSTRACT

The state of grapes' health is crucial to the quality of wines. In winemaking, it is common knowledge that grapes affected by stem rot acidic create wines of lesser quality and higher microbial instability. However, it is not clear the real contribution to the alcoholic fermentation and to the final quality of wines made from rotten grapes.

The overall objective of this study was to evaluate the use of grapes affected by sour rot in alcoholic fermentation and the final quality of wines. For that, microvinification of healthy grapes belonging to the caste of Trincadeira Preta were performed to which were added grapes affected by sour rot in two different concentrations (of 30% and 50%, respectively) and healthy grapes of Cabernet Sauvignon (to which 30% of Trincadeira rotten was added). Fermentations were followed bi-daily and density and temperature were removed, as also as samples, in order to determine the volatile acidity content during fermentation. Wines were subjected to conventional chemical analysis and results revealed that wines with routs' arrangements show an increase in the values of colour intensity, total anthocyanins and total phenols directly proportional to the increase in the percentage of rot added. It was also found that there is a clear concentration of sugar in the grape and hence in the alcohol content, while the measure of the concentration of grape rot increases. Wines and musts were subjected to analysis by Spectrometry Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), which results showed that the parameter index rout obtained by FTIR analysis determine clearly the different levels of sour rot presented in different test procedures. Microbiological analysis performed did not show any significant increase in total yeast when a medium with biphenyl generic GYP is used. It was made a detection of yeasts for amendment of wines using a specific culture media with DBDM and ZDM, noting the presence of *Dekkera* / *Brettanomyces* in 3 of the tests made. Its presence can be explained by contamination from the cellar, whereas, after 6 months probation wines were subjected to further analysis and no contamination was detected. These wines were also subjected to sensory analysis, before and after malolactic 6 months in bottle stage, in order to evaluate its aromatic profile. Results show no statistically significant differences between test and control levels of sour rot and it was noted that wine, to which rotten grapes were introduced, had a more complex aromatic profile than the witnesses.

KEY- WORDS: Sour rot, quality wine, alcoholic fermentation, sensorial analysis, yeast contamination.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Qualidade da uva

A videira é, sob o ponto de vista económico, uma das espécies produtoras de frutos mais importante no mundo, com diferentes utilidades, desde a produção de vinho, de uva de mesa, de uvas secas e de diversos compostos orgânicos (Aigrain, 1999). *Vitis vinífera,* representa a principal espécie cultivada, devido à sua grande aptidão para a produção de vinhos. Em Portugal, a vinha é cultivada praticamente em todo o território incluindo Açores e Madeira. Em muitas regiões é a principal actividade agrícola, constituindo uma das maiores riquezas da agricultura portuguesa (Lopes, 2005).

A qualidade do vinho tem uma relação directa com a qualidade das matérias-primas. As uvas utilizadas para a produção de vinho bem como, os métodos utilizados para o cultivo destas têm uma relação crítica com o produto final (Charters *et al*., 2007), sendo, geralmente, aceite que a utilização de uvas em deficiente estado sanitário contribui para a produção de vinhos de baixa qualidade e com fraco poder de conservação.

1.2. Doenças e pragas da videira

Os inimigos das culturas, também designadas organismos prejudiciais, são organismos que pela sua actividade podem contribuir para a redução quantitativa ou qualitativa da produção de uma cultura (Amaro, 2003). O conceito de inimigo da cultura é condicionado por três factores: cultura, ambiente e tempo (Amaro, 2003).

Os inimigos das culturas podem ser agrupados em pragas, patogénios causa de doenças e infestantes. As pragas abrangem organismos animais como ácaros, insectos, moluscos e vertebrados (ex.: roedores, aves) (Amaro, 2003).

As doenças podem ser causadas por fungos, falsos fungos, bactérias, vírus. Os nématodos, embora animais, são tradicionalmente considerados como causa de doenças. As infestantes são plantas que se desenvolvem onde não é desejável segundo o interesse do Homem (Amaro, 2003).

Segundo Amaro (2003) o comportamento de uma praga, condicionado pelo seu potencial biótico e pela resistência do ambiente, pode levar à sua classificação em:

- Inimigo Potencial – não atingem o nível económico de ataque, pelo que não é necessário proceder a tratamentos;

- Inimigo Ocasional – o seu aparecimento deve-se a razões climáticas, mas também por excesso de luta química;
- Inimigo Permanente ou inimigo chave – todos os anos ocorrem ataques de certas pragas, tornando-se indispensável a realização sistemática de tratamentos.

Se considerarmos os inimigos que todos os anos apresentam um risco para a vinha, obrigando a fazer tratamentos para evitar ou atenuar os prejuízos, como oídio, o míldio, a podridão cinzenta, a traça da uva e as infestantes vegetais (Amaro & Couto, 2004), ver tabela 1.

Tabela 1 – Inimigos – chave e inimigos ocasionais da vinha. Adaptado (Amaro& Freitas, 2004).

Classificação	Nome vulgar
Inimigo – Chave	Míldio Oídio Podridão – cinzenta Traça da uva Infestantes Vegetais
Inimigo ocasional	Esca Escoriose Eutipiose Podridão – radicular Outras podridões Ácaros tetraniquídeos Áltica Cigarrinha – verde Cochonilha

1.3. Ecologia Microbiana das Uvas

As uvas sãs e maduras possuem uma carga microbiana de 10^3-10^5 UFC/g constituída principalmente por leveduras, várias espécies de bactérias lácticas e acéticas e fungos filamentosos (Fleet, 1999). As leveduras localizam-se, principalmente, nas zonas da película onde possa existir libertação de mosto, bem como junto ao pedicelo, aos estomas, e em microfissuras, onde a integridade da camada cuticular cerosa foi alterada. A existência de leveduras fermentativas, como *Saccharomyces cerevisiae*, é superior quando a película da uva é lesada ocorrendo libertação de mosto para a superfície destas (Mortimer & Polsinelli, 1999) e aumentando a carga microbiana para 10^6-10^8 UFC/g (Fleet, 1999) quando comparada com a de uvas sãs. Tendo em consideração que a maioria das espécies de leveduras de alteração de vinhos são igualmente fermentativas, Loureiro & Malfeito-Ferreira (2003) colocaram a hipótese de que o conhecimento da forma de disseminação destas leveduras melhoraria se fosse dada mais atenção à microbiologia das uvas afectadas.

No cacho, os bagos mais próximos do pedúnculo possuem 10 a 100 vezes mais leveduras do que os bagos na base (Rosini *et al.,* 1982). No entanto, é importante referir que a sucessão microbiana durante a fermentação é, normalmente realizada em mostos de uvas sãs (Fleet, 2003), esquecendo o enorme contributo das uvas podres para a diversidade da flora microbiana (Barata *et al*., 2008a, b). A disseminação das leveduras na superfície dos bagos é muito variável (van der Westhuizen *et al*., 2000a, b) e a existência de uvas em mau estado sanitário altera completamente o número e a diversidade das espécies isoladas. Na vinha, as leveduras e de fungos leveduriformes têm origem no solo, ar, outras plantas e vectores animais (Davenport, 1974), sendo os insectos os principais vectores de disseminação das leveduras (Mortimer and Polsinelli, 1999).

A microflora presente na superfície das uvas é afectada por um grande número de factores que influenciam a proporção de diferentes espécies de leveduras, sendo o estado fitossanitário das uvas um dos principais factores (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

A sanidade das uvas é afectada pelo grau de maturação, pela chuva, temperatura, irradiação, vento, sensibilidade da casta e aplicação de fitofármacos (Sabate.*et al*, 2002, van der Westhuizen *et al*., 2000b, Rosini *et al*., 1982, Devenport, 1974). No entanto, os estudos, de ecologia microbiana realizados em vinhas e à superfície das uvas são relativamente escassos quando comparados com os realizados em mostos e na sua fermentação além disso, a maioria dos autores utilizou técnicas inadequadas de amostragem, pré-isolamento, enriquecimento e cultivo (Barata *et al*., 2004), contribuindo para que a flora microbiana contaminante deste ecossistema seja, ainda, mal conhecida (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

1.4. Podridão Cinzenta versus Podridão Ácida

Segundo Bisiach *et al*. (1986), a podridão cinzenta e ácida confundiam-se bastante, a ponto de se pensar que esta última era um estado final e mais destrutivo da primeira, e segundo alguns autores parece haver um certo antagonismo entre *Botrytis cinerea*, patogénio da podridão cinzenta e os agentes da podridão ácida, não se verificando o simultâneo desenvolvimento das duas podridões (Amaro & Freitas, 2004). Por esta razão é necessário definir cada uma das doenças e diferenciá-las convenientemente.

1.5. Podridão cinzenta

1.5.1. Biologia e epidemiologia

Os principais problemas fitossanitários da vinha devem-se a fungos, sendo o mais comum, a podridão cinzenta. De acordo com Tomaz & Costa (1983), o agente responsável, é um fungo cujo teleomorfo é *Botrytinia fuckeliana* e o anamorfo *Botrytis cinerea*. Este fungo também designado por podridão dos cachos, ou simplesmente *Botrytis*, afecta a qualidade e a quantidade da produção de uva (Santos, 2007). Em 1984, foi descrito pela primeira vez, o parasitismo do fungo sobre folhas de videira (Bernard & Bugaret, 1989). Uma das principais características deste fungo é, apresentar um comportamento parasita tão importante como o de saprófita, tendo a capacidade de colonizar diversos detritos vegetais em decomposição, desenvolver-se vigorosamente a partir da sua base nutritiva e contaminar os órgãos sãos (Dubos, 1985). Assim, existe sempre no ambiente a presença de esporos ou micélios, quer sobre o material vegetal vivo quer morto, capaz de causar prejuízos se as condições climáticas e fisiológicas do hospedeiro forem propícias (Silva, 1980).

O fungo hiberna durante o Inverno como escleroto sobre sarmentos, sendo bem visíveis as manchas necrosadas; como micélio nas fendas do ritidoma e, em menor quantidade, nas gemas (Costa *et al*., 2004). Na Primavera, em condições de humidade e temperatura favoráveis, dá-se a formação de conidióforos a partir dos esclerotos e micélios. Os conidióforos produzem nas extremidades uma grande quantidade de conídios que são arrastados pelo vento e pela chuva, contaminando os órgãos verdes da cepa (Costa, *et al.,* 2004). Os conídios têm a capacidade de penetrar directamente nos tecidos vegetais, no entanto, esta acção é facilitada se existirem feridas na planta.

Os conídios germinam, formando o micélio no interior do órgão atacado que, depois de destruir os tecidos parasitados, sai para o exterior produzindo novos conidióforos com conídios. Inicialmente estes, são brancos, mas ao fim de alguns dias adquirem a cor típica acinzentada, que caracteriza a doença. Estes produzem novas contaminações ao longo da fase vegetativa da videira até ao Outono, período que dá origem aos órgãos de resistência (Perez, 1998).

No pintor ocorre uma diminuição dos compostos naturais anti-fungícos recomeçando a actividade enzimática da *Botrytis*, provocando a destruição celular acompanhada de necrose e o aparecimento de podridão cinzenta (Doumergue, 2000).

É durante a maturação que os cachos apresentam a máxima susceptibilidade, uma vez que, a concentração de açúcares nos bagos aumenta contribuindo para o desenvolvimento do fungo (Perez, 1998).

Os factores climáticos têm uma influência muito importante no desenvolvimento do fungo. Para ocorrer a germinação dos conídios é necessária uma humidade e temperaturas próximas dos 18 ºC (Costa *et al.,* 2004).

As feridas favorecem a entrada do fungo, tais como as produzidas pelo ataque de traça da uva, oídio, granizo (Perez, 1998) ou as microferidas produzidas pela queda das caliptras (Doumergue, 2000). As castas com cachos mais compactos e de epiderme mais fina são mais sensíveis ao fungo, assim como em vinhas onde se fertiliza com excesso de azoto (Perez, 1998), ou que estão implantadas em solos magros, com um regime hídrico irregular (Doumergue, 2000).

1.5.2. Sintomatologia

A podridão cinzenta é conhecida por afectar todos os órgãos verdes da videira. Nas folhas, os sintomas manifestam-se frequentemente, na borda do limbo, evidenciando grandes manchas acastanhadas. Se houver humidade no ar aparece sobre as manchas acastanhadas um polvilho acinzentado (Perez, 1998).

Durante a floração, sobretudo quando se dá a libertação das caliptras, os sintomas também são traduzidos por manchas acastanhadas sobre as inflorescências. Do pintor à colheita os bagos apresentam uma cor castanha violácea, aspecto característico de podre, desenvolvendo-se sobre a sua superfície um bolor cinzento (Perez, 1998). Os bagos ficam engelhados e secam, cobrindo-se do bolor cinzento ou cinzento oliváceo. Boa parte do cacho ou mesmo a sua totalidade pode ser afectada, com o consequente apodrecimento do, bago, os bagos situados abaixo da zona necrosada acabam por secar por falta de alimentação podendo o próprio cacho cair quando a zona atingida não suporta o peso das uvas (Costa *et al*., 2004) (Fig.1) e (Fig.2).

Os ataques nos cachos podem ser divididos temporalmente: os mais precoces (considerados os mais perigosos), que ocorrem antes da floração, podendo provocar a dissecação total ou parcial das inflorescências e os mais tardios, durante a fase de maturação (Costa *et al*., 2004). Estes ataques podem ser confundidos com os do míldio, embora este último provoque o característico encurvamento dos cachos (Costa *et al*., 2004).

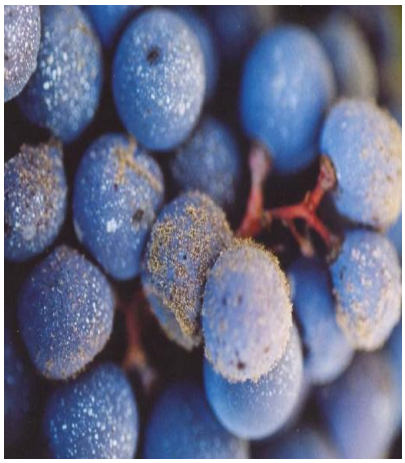

Figura 1 – Cacho afectado por podridão cinzenta, (Gomes, 2006).

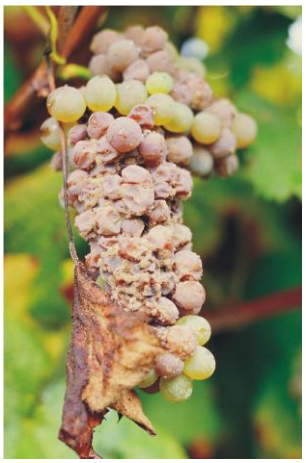

Figura 2 – Cacho completamente destruído por *Botrytis cinerea* (Coutinho, 2002).

A principal característica do desenvolvimento da podridão cinzenta é a formação de uma "teia de micélios" sobre a superfície das uvas, ocorrendo uma rápida contaminação dos bagos vizinhos devido à elevada actividade biológica do micélio (Donèche, 1992).

Durante a floração ou após o pintor, os ataques podem provocar uma importante diminuição da colheita mas, para além disso, ainda podem diminuir a qualidade dos futuros vinhos (Perez, 1998).

1.5.3. Alteração da composição química dos vinhos

Os principais indicadores químicos da utilização de uvas podres nos vinhos são a presença e concentração de etanol, glicerol, ácido glucónico, ácido galacturónico, ácido cítrico, lacase e ácido acético (Zoecklein *et al*., 2000b).

Dentro do bago o micélio do fungo desenvolve-se, consumindo grandes quantidades, de ácidos orgânicos, matérias azotadas e açúcares. Esta redução de açúcar nem sempre é compensada pelo efeito de concentração que ocorre pela evaporação da água que os bagos sofrem à medida que a podridão se desenvolve. A invasão dos cachos pelo fungo, num primeiro momento, provoca a degradação da pectina das paredes celulares, conduzindo à morte das células da película e ao seu rebentamento. As antocianas da película são destruídas, provocando a diminuição da cor nos vinhos tintos (Grasin *et al*., 1987).

Os estragos mais graves resultantes da presença de podridão cinzenta nas uvas no momento da vindima são os fenómenos de oxidação (Grassin *et al*., 1987), acompanhados pela produção e libertação de uma enzima, a lacase, que provoca problemas de estabilidade e de qualidade no vinho desempenhando um papel primordial no processo alteração,

levando à oxidação dos compostos fenólicos (Donèche, 1992). No vinho, em presença do oxigénio, a lacase consegue degradar irreversivelmente os polifenóis (antocianas e taninos) responsáveis pela cor dos vinhos (Grassin *et al*., 1987).

Os ataques de podridão cinzenta têm consequências nefastas durante a vinificação, pois a composição da uva é modificada. O fungo consome os açúcares da uva (uvas podres apresentam uma concentração de açúcar de 230 g/l) provocando a acumulação de glicerol e ácido glucónico (Donèche, 1992). Dá-se a degradação da película, com destruição a matéria corante, obtendo-se o acastanhamento dos vinhos tintos e a redução das substâncias aromáticas. A podridão provoca a diminuição do ácido tartárico, com consequente diminuição da estabilidade do vinho (Doumergue, 2000).

O envelhecimento do vinho condições pode ser comprometido pela redução de aromas, pela presença de odores desagradáveis e pela destruição de antocianas e taninos por acção da lacase (Doumergue, 2000). Basta pequenos ataques de podridão cinzenta para que numerosas substâncias aromáticas desapareçam e haja a eliminação dos aromas específicos da casta, aspecto particularmente importante nas castas brancas. Na elaboração dos vinhos, observa-se o aparecimento de odores e gostos desagradáveis, provenientes de alterações de metabolismos naturais em consequência da presença do fungo (Grassin *et al*., 1987). As uvas contaminadas possuem um sabor amargo, com aromas fenólicos e a iodo (Donèche, 1992).

1.5.4. Relação entre traça da uva e podridão cinzenta

A podridão cinzenta é muitas vezes associada à traça da uva (*Lobesia botrana*), pois é responsável por atacar os cachos desde da sua formação, até à vindima, existindo duas espécies a *Lobesia botrana* a mais comum, e a *Eupoecilia ambiguella* (Coutinho, 2002).

Para além dos prejuízos associados ao ataque da traça da uva, em determinadas regiões, estes podem ser gravemente aumentados pelo desenvolvimento de diversas podridões do cacho, como a podridão cinzenta e a podridão ácida, uma vez que as feridas provocadas pela traça da uva facilitam a entrada dos agentes patogénicos (Amaro *et al*., 2001).

Corroborando com esta ideia, Fermaud (1991) considera que os estragos directos provocados pela traça da uva são pouco importantes em comparação com os estragos indirectos, que facilitam quer a penetração dos agentes patogénicos da podridão cinzenta, quer de outros de carácter secundário, como os dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

1.6. Podridão ácida

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da incidência de podridões das uvas, em especial, a podridão cinzenta, cujo agente é totalmente conhecido, mas também existe outras podridões ainda mal compreendidas e controversas, como é o caso da podridão ácida. Embora sendo uma doença mais esporádica que a podridão cinzenta, não é uma doença nova, apesar dos conhecimentos sobre ela e a sua etiologia serem muito mais limitados (Gravot *et al*., 2001). Esta doença foi descrita pela primeira vez em Itália. Trata-se de uma doença grave das uvas que ocorria frequentemente, no norte e na região central de Itália, durante os períodos de chuva prolongada (Bisiach *et al*., 1982). No entanto, tem assumindo uma prevalência cada vez maior, tanto em Portugal como noutros países vitícolas, originando grandes perdas de colheita (Gomes, 2004). Os ataques manifestam-se com intensidade variável, a sua aparição é repentina, provavelmente, devido à combinação favorável de diversas condições fisiológicas determinadas pelo clima e as práticas de cultura. Além disso, as características da casta apresentam uma importância considerável (Guerzoni & Marchetii, 1987).

1.6.1. Etiologia

A podridão ácida é uma doença atípica, visto que os agentes causadores raramente são considerados patogénicos primários e não existe um agente etiológico específico. Desenvolve-se quase sempre após o pintor, parece necessitar de combinações simultâneas de condições fisiológicas favoráveis, determinadas pelo clima e pelas práticas culturais e de certas características da sensibilidade da casta (Bisiach *et al*., 1986; Gravot *et al*., 2001; Guerzoni & Marchetti, 1987;Laurent, 1998; Marchetti *et al*., 1984).

1.6.1.1. Condições favoráveis ao desenvolvimento da doença

De acordo com vários autores (Gravot *et al.* (2001), Blancard *et al.* (2000), Laurent (1998), Meroni *et al.* (1996), Galet (1995) e Bisiach *et al*., (1986)),e para o desenvolvimento da podridão ácida é necessária a ocorrência de condições favoráveis, resumidas na figura 3:

- Existência de feridas na película dos bagos devido à acção de agentes bióticos: o estado fitossanitário da vinha reveste-se de grande importância, uma vez que outros inimigos da cultura, como os agentes do míldio (*Plasmopara vitícola*), do oídio (*Uncinula necator*), as traças da uva (*Lobesia botrana*), cochonilhas (*Eupoecilia ambiguella*), vespas, pássaros, etc., podem causar uma deterioração mais ou menos agravada da película dos bagos. Em Montpellier, verificou-se que

os maiores ataques ocorreram em vinhas híbridas que não são tratadas contra aquelas doenças, além disso, a degeneração dos estomas também pode originar feridas (Laurent, 1998);

- Utilização de castas sensíveis que está relacionada com a espessura menor da película dos bagos e com a existência de cachos muito compactos e com bagos grandes, verifica-se o aparecimento de microfissuras, que constituem locais privilegiados para a instalação da flora microbiana. Além disso, a sensibilidade aumenta com a maturidade;
- Presenças de vectores na vinha, como os insectos, nomeadamente as *Drosophilas*, efectuam posturas nas lesões existentes nos bagos, sendo vectores de leveduras, bactérias e bolores;
- Acontecimentos climáticos, como a ocorrência de períodos chuvosos na altura do pintor, após um período de seca, provoca um aumento repentino do tamanho dos bagos, com o consequente rebentamento da película, o granizo bem como, temperaturas e humidades elevadas próximo da maturação e em, especial durante a noite, são favoráveis ao desenvolvimento da doença;
- Práticas culturais que levam ao aumento do vigor das vinhas, provocando um aumento da densidade da folhagem, o sistema de condução utilizado, a fertilização, o porta-enxerto, são práticas culturais que permitem evitar teores de humidade relativa elevados no interior da videira. É de salientar, que a incidência da doença aumenta não só com a realização tardia da vindima, mas também com a monda de cachos efectuados após o pintor. Nos casos em que estes são deixados no solo, as alterações a que estes estão sujeitos aumentam os focos da doença, sobre os quais os vectores se vão alimentar.

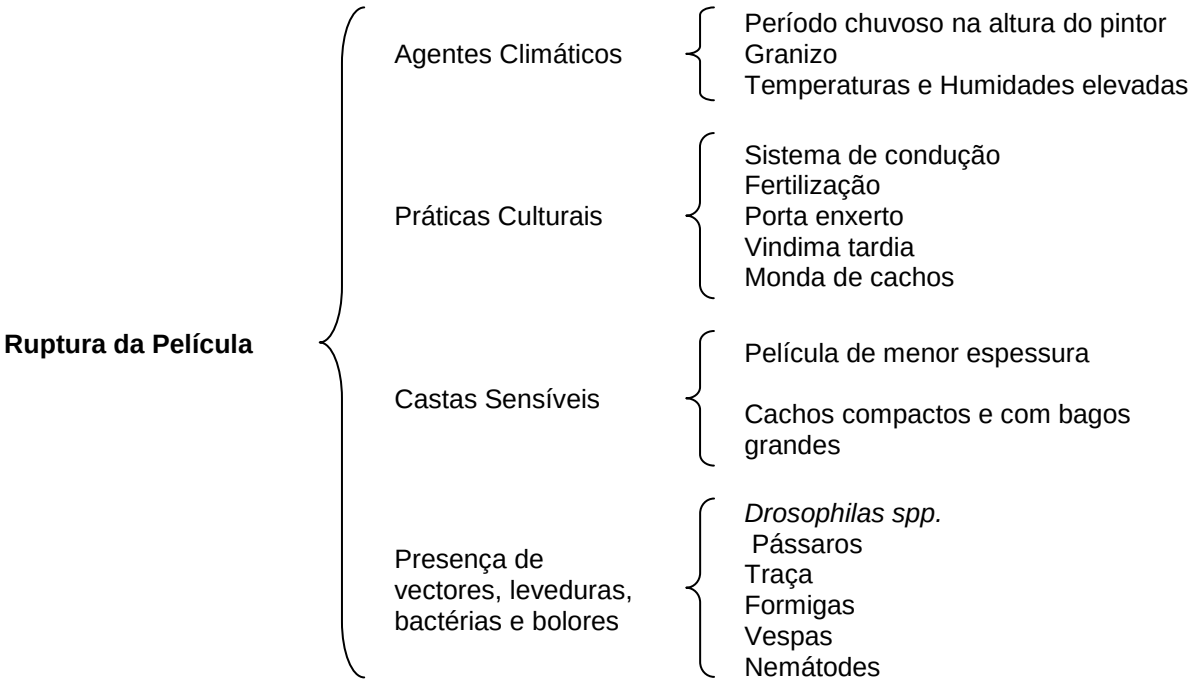

Figura 3 – Condições favoráveis ao desenvolvimento da podridão ácida

1.6.1.2. Microrganismos envolvidos na podridão ácida

Através de vários estudos desenvolvidos verificou-se que a flora dominante da podridão ácida é constituída essencialmente por leveduras e bactérias acéticas (Guerzoni & Marchetti, 1987 e Bisiach *et al*., 1986;). As leveduras que mais frequentemente são isoladas de bagos afectados por podridão ácida pertencem às espécies *Hanseniaspora uvarum*, *Torulopsis stellata*, *Metshnikowia pulcherrima*, *Candida krusei* e *Kloeckera apiculata* (Guerzoni e Marchetti, 1987 e Bisiach *et al*., 1986).

Em França, Gravot *et al. (*2001) e Blancard *et al. (*2000) apontam as leveduras *Kloeckera apiculata* (ou a sua forma telemórfica *Hanseniaspora uvarum*), *Candida stellata* e *Pichia membranaefaciens*, como sendo as mais frequentemente isoladas de bagos com podridão ácida. Estes últimos autores referem também a presença de outras espécies de leveduras embora mais esporadicamente, como *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula* spp., *Candida krusei* e *Zygosaccharomuces rouxii*.

Os trabalhos de Laurent (1998), apontam quatro espécies de leveduras como sendo as mais importantes: *Candida diversa*, *C. stellata*, *Kloeckera apiculata* e *Metschnikowia pulcherrima*. Este autor refere ainda que *M. pulcherrima* é maioritária no início do ataque mas, quando a doença já se encontra em estado avançado, as espécies do género *Candida* (*C. diversa*, *C. stellata*) passam a ser a mais representativas.

Guerzoni & Marchetti (1987) verificaram que as populações de leveduras presentes em uvas afectadas por podridão ácida diferem da flora que coloniza a superfície das uvas sãs quer em quantidade quer na variedade de espécies isoladas. Mais recentemente, Barata *et al.* (2008b), demonstrou que a utilização de uvas danificadas constitui um factor determinante na ecologia das leveduras presente na superfície das uvas e que é necessária a utilização de um meio selectivo para caracterizar as leveduras presentes na superfície das uvas.

Estes autores, efectuaram um amplo estudo, durante alguns anos, dos microrganismos associados à podridão ácida e isolaram várias espécies de leveduras (tabela 2). Barata *et al*. (2004) demonstraram que a utilização de uvas com podridão ácida contribuiu para o aumento da biodiversidade de leveduras e potencia o desenvolvimento de leveduras de alteração, como *Zygosaccharomyces bisporus, Z. bailii* e *Pichia* sp.. Este efeito é tanto mais visível quanto maior a percentagem de uvas afectadas, demonstrando a elevada capacidade de crescimento destas leveduras na presença de elevado stress ambiental, resultante da presença de ácido acético e outros metabolitos produzidos durante o processo de apodrecimento das uvas afectadas por podridão ácida. A presença de leveduras do género *Zygosaccharomyces* constitui um indicador de futuros problemas de alteração dos vinhos e permite considerar as uvas podres como um dos principais veículos de leveduras de alteração de vinhos nas adegas (Barata *et al*., 2004).

Marchetti *et al.,* 1984 tinham conseguido estabelecer um modelo químico da doença constante e reproductível, *in vitro,* com espécies como *M. pulcherrima* e *H. uvarum*, isoladas ou em associação, tendo detectado, frequentemente, actividades pectolíticas extracelulares em estirpes de *Saccharomyces crataegensis*, isoladas de bagos podres. Provavelmente, estas espécies, incapazes de produzir os metabolitos voláteis característicos da doença (como o acetato de etilo e o seu precursor, o ácido acético), poderão favorecer a penetração das outras espécies nos tecidos dos bagos.

Guerzoni & Marchetti (1987) chamaram a atenção para o facto de apenas as leveduras dos géneros *Candida* e *Dekkera* serem capazes de produzir quantidades de ácido acético tão elevadas como as que ocorrem nos ataques de podridão ácida, nos bagos podres. A quantidade de ácido acético varia entre 0,3 e 12,4 g/l de sumo, e apenas as espécies acima indicadas conseguem produzir teores de ácido acético iguais ou superiores a 1 g/l. Os mesmos autores colocam a hipótese das condições anaeróbias que se fazem sentir no interior dos bagos, ou em muitos casos, o potencial redox e suas variações, poderem criar condições que induzem as leveduras a aumentar a produção de ácido acético e de acetato de etilo.

Tabela 2 – Principais espécies de leveduras isoladas em uvas afectadas por podridão ácida comparativamente com uvas sãs (Barata *et al*., 2008a).

Grupo de leveduras	Leveduras	Uvas sãs	Uvas com podridão ácida
Basidiomicetas		+	+
Oxidativas ou fracamente fermentativas	*Candida amapae*		+
	Candida diversa		+
	Candida ethanolica		+
	Candida stellata/ C. zemplinina	+	+
	Candida tropicalis		+
	Candida vanderwaltii	+	+
	Hanseniaspora uvarum	+	+
	Hanseniaspora guilliermondii		+
	Hanseniaspora occidentalis		+
	Hanseniaspora osmophila		+
	Pichia galeiformis		+
	Pichia guilliermondii		+
	Pichia kluyveri		+
	Pichia membranifaciens	+	+
Issatchenkia spp.	*Issatchenkia occidentalis*		+
	Issatchenkia orientalis		+
	Issatchenkia terricola		+
Zygoascus hellenicus			+
Lachancea thermotolerans		+	+
Zygosaccharomyces spp.	*Zygosaccharomyces bailii*		+
	Zygosaccharomyces bisporus		+

Para além das leveduras produtoras de ácido acético, na opinião de Laurent (1998) as bactérias lácticas também são responsáveis pela produção de ácido acético através do pico láctico. No entanto, de acordo com Gravot *et al*. (2001), Blancard *et al*. (2000), Meroni *et al*. (1996), e Bisiach *et al.* (1986) as bactérias mais frequentes nos bagos atingidos por podridão ácida não são as lácticas, mas sim as acéticas. Segundo Sponholz (1992), as leveduras metabolizam os açúcares das uvas, produzindo etanol, que é depois oxidado em ácido acético pelas bactérias acéticas. Dentro destas, as espécies mais importantes parecem ser as do género *Gluconobacter* spp., embora *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus*, também possam a parecer, mas mais raramente. Todas estas bactérias têm um poder semelhante de alteração dos bagos e, tal como as leveduras, fazem igualmente parte da microflora natural dos bagos (Gravot *et al*., 2001, Blancard *et al*.,2000, Meroni *et al*., 1996)e Bisiach *et al.*, 1986;

Quer no caso das leveduras como das bactérias, Gravot *et al*. (2001) e Blancard *et al*. (2000) encontraram diferenças de agressividade entre os isolados pertencentes a uma mesma espécie. Experiências efectuadas por estes autores, em pleno campo, revelaram que a *K. apiculata*, *C. stellata*, *Gluconobacter* spp., e em menor grau a *Acetobacter pasteurianus* e *A. aceti*, são capazes de induzir alterações em bagos comparáveis às produzidas pela podridão ácida. Na opinião Gravot *et al*. (2001) e Blancard *et al*. (2000)

serão portanto, estas leveduras e as bactérias acéticas que terão um papel crucial na iniciação e no desenvolvimento da doença, contrariando os trabalhos desenvolvidos por Bisiach *et al.* (1986) e Marchetti *et al.* (1984) cujos microrganismos envolvidos eram limitados (*Hanseniaspora uvarum*, *Torulopsis stellata*, *Metshnikowia pulcherrima*, *Candida krusei* e *Kloeckera apiculata)*. Por outro lado, Lisperguer *et al*. (2003) explicam que a doença está associada a um complexo de organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, presentes naturalmente nas vinhas e que somente sob certas condições é que se tornam prejudiciais.

Alguns autores têm sugerido a influência de fungos pertencentes ao género *Aspergillus* no aparecimento da podridão ácida. Vários estudos realizados em diferentes países têm revelado que *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* são os aspergilos predominantes na vinha (Battilani *et al*., 2006, Bejaoui *et al*., 2006; Tjamos *et al*., 2006; Perrone *et al*., 2006 e Serra *et al*., 2003). O solo e os detritos da videira no solo são as principais fontes de *Aspergillus spp.* na vinha (Kazi *et al*., 2007).

O *Aspergillus* parecem ser invasores secundários das uvas depois de estas terem sido danificadas pelas chuvas durante o período de maturação, outros fungos, insectos, impactos mecânicos ou mesmo outros factores (Leong *et al*., 2006). Sabe-se que tanto o *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* são produtores de ocratoxina A (OTA) (Abrunhosa *et al*., 2001; Battilani *et al*., 2001;2003; Cabanes *et al*., 2001; 2002; Serra *et al*., 2003; Tjamos *et al*., 2006). Algumas micotoxinas tem sido mencionadas nas uvas (patulina, aflotoxina, tricotecenos), mas a OTA é considerada a mais tóxica para a indústria do vinho (Hocking *et al*., 2007). A OTA é uma micotoxina com propriedades carcinogénicas, imunotóxicas, nefrotóxicas e hepatotóxicas (Malfeito-Ferreira *et al*., 2009). No entanto, é impossível eliminar as micotoxinas a partir da uva principalmente porque é altamente estável e os fungos produtores são uma parte integrante da ecologia associada com a uva (Bleve *et al*., 2006). Actualmente, a pesquisa visa ao desenvolvimento de estratégias de controlo biológico natural para reduzir a presença de fungos e a produção de ocratoxinas (Dimakopoulou *et al*., 2008).

1.6.1.3. Insectos - Vectores

Os vectores mais importantes da podridão ácida parecem ser os dípteros do género *Drosophila*, em particular *Drosophila melanogaster* que, pelo menos em França, constitui a maior parte da população do género encontrada nas vinhas, próximo da altura das vindimas (Laurent, 1998). Em trabalhos desenvolvidos em França, mais propriamente em Bordéus, foram identificados duas espécies de *Drosophila spp.,* a *Drosophila melanogaster* e

Drosophila simulans nas vinhas (Gravot, 2000), no entanto em anos propícios ao desenvolvimento de podridão ácida a espécie *Drosophila melanogaster* é predominante (Fremaud, *et al*., 2002).

Estes insectos de pequenas dimensões, com adultos com 4 mm de comprimento, amarelo acinzentado, com típicos olhos encarnados e larvas brancas, possuem o abdómen negro, são atraídas por substâncias odoríferas e pelos materiais em decomposição. As fêmeas efectuam as posturas, de coloração branca, nas lesões existentes nos bagos, ao mesmo tempo que se "carregam" de leveduras e bactérias, que transportam depois de bago em bago, não só de forma externa (na cutícula e nas patas), mas também internamente. Certos esporos permanecem viáveis mesmo após o trânsito intestinal no insecto (Amaro & Freitas, 2004).

A *Drosophila spp*. assegura uma grande difusão e proliferação dos microrganismos nos locais privilegiados para o efeito, isto é nas feridas dos bagos (Bisiach *et al.,* 1986; Laurent, 1998; Meroni *et al.,* 1996 e Delpuech, 1993). Os primeiros estudos foram realizados por Phaff *et al.* (1956) que isolou leveduras como *Hanseniaspora uvarum, Kloeckera apiculata, Candida stellata e Candida krusei* do tubo digestivo de diferentes espécies de *Drosophila* spp. Fermaud *et al.* (2000) isolaram frequentemente *Kloeckera apiculata* e *Candida stellata,* não só da superfície (sobretudo tórax e das patas), mas também do papo de espécies de *Drosophila melanogaster* e de *Drosophila simulans*, colhidos em vinhos da região francesa de Bordéus. Pontualmente, outras leveduras, como *Metshnikowia pulcherrima* e *Candida krusei*, e diversos fungos filamentosos, como *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. e *Botrytis cinerea*, também foram isolados a partir de exemplares de *Drosophila* spp. (Fermaud *et al*., 2002). Relativamente, à flora bacteriana, estes autores encontraram frequentemente *Gluconobacter* spp., quer na superfície quer no papo e, com menor frequência, *Acetobacter pasteurianus*. O poder fitopatogénico destes microrganismos, transportados pelos insectos, revelou-se semelhante ao dos microrganismos presentes no interior dos bagos podres (Fermaud *et al*., 2002).

Trabalhos recentes desenvolvidos por Barata *et al*., (2009), afirmam que o desenvolvimento da podridão ácida na vinha é dependente da presença das moscas *Drosophila* sp. na superfície das uvas. Afirmam também que as *Drosophila* sp. induzem o aumento da população bacteriana das uvas danificadas pela podridão ácida trazidas pelas moscas da fruta. A *Zygoascus hellenicus* e *Issatchenkia terricola* apenas foram detectadas em uvas danificadas por podridão ácida e são transportados pelas moscas *Drosophilas* spp. (Barata *et al.,* 2009).

Outro vector também referido na bibliografia associada à podridão ácida são os nemátodos. Trabalhos desenvolvidos em Verona, Itália, por Shann (1987a) revelaram que as *Drosophila* spp. para além de transportarem a flora microbiana habitual, transportam uma espécie de nemátodo o *Panagrellus zymosiphilus* encontrado em bagos com podridão, na forma de ovos, larvas e adultos. Este nemátodo é portador de leveduras e que poderá ser transmitido pelas moscas (Shann, 1987b). Também Smith *et al*., (1992), provou que a partir da espécie *Botryozyma nematodophila* foram isolados o nemátodo (*Panagrellus zymosiphilus*) proveniente de uvas afectadas com podridão ácida.

Também Lorrain & Romero (1999) detectaram a presença sistemática de populações consideráveis de nemátodos do grupo dos saprófitas- bacteriófagos, à superfície ou no interior dos bagos atacados por podridão ácida. Estes nemátodos, coabitavam com as larvas de *Drosophila* spp. Segundo aqueles autores, o nemátodo pode ter um papel importante nas fases de explosão da doença, durante os períodos húmidos, nos quais ele possui uma actividade externa muito intensa, colonizando todo o cacho, servindo-se de microfissuras existentes na película, em particular nas zonas de inserção peduncular. O nemátodo pode favorecer, deste modo, o alastramento da podridão ácida aos bagos sãos explicando, assim, a acção favorável que a humidade tem no desenvolvimento da doença.

1.6.2. Sintomatologia

A podridão ácida manifesta-se após o pintor, em particular na fase avançada de maturação, onde ocorre o aumento do teor de açúcar favorecendo o desenvolvimento desta doença (Guerzoni & Marchetti, 1987 e Bisiach *et al*., 1986;). O ataque inicia-se na proximidade da zona de inserção peduncular ou ao nível das feridas existentes nos bagos, nomeadamente devido a bicadas de pássaros, acção de insectos, agentes patogénicos, granizo e micro/ macro fissuras resultantes das variações do tamanho dos bagos, associados a alternância de períodos de stress hídrico com outros de abundância de água (Gravot *et al*., 2001). Esta doença é responsável por alterações típicas e facilmente reconhecidas, caracterizadas pelo acastanhamento e desagregação da polpa (Bisiach *et al*., 1986; Guerzoni & Marchetti, 1987). Os tecidos alterados são oxidados e adquirem uma coloração variável em função do estado de evolução da podridão e da casta em questão. Os bagos pertencentes a castas brancas, adquirem uma tonalidade castanha (Fig.4), enquanto nas castas tintas a coloração é castanha violácea ou avermelhada (Fig.5 e Fig.6). Os bagos alterados por bactérias acéticas apresentam, por vezes, uma cor mais clara do que a que é induzida por leveduras (Gravot *et al.,* 2001; Blancard *et al.,* 2000 e Guerzoni & Marchetti, 1987).

Após o inicio da infecção a podridão ácida alastra-se rapidamente à totalidade do bago, fazendo com que a película se torne frágil até à ocorrência da ruptura do bago. Como consequência, ocorrem escorrimentos de sumo vão dar um aspecto luzidío aos bagos situados mais abaixo. Esta situação favorece as contaminações secundárias por escorrimento ou por contacto entre bagos podres e bagos sãos, sobretudo em cachos mais compactos (Guerzoni & Marchetti, 1987 e Bisiach *et al*., 1986). Por último, os bagos ficam ocos/secos em relação ao seu conteúdo visto que este é utilizado na sua totalidade devido à completa fermentação e desintegração da polpa restando apenas a película seca e mumificada (Bisiach *et al*., 1986). Uma característica da podridão ácida é o odor a ácido acético ou vinagre, por vezes bastaste forte, que emana dos cachos e das videiras parcialmente atacadas, e que resulta dos elevados teores a ácido acético, e em menor grau, de acetato de etilo formado (Guerzoni & Marchetti, 1987 e Bisiach *et al*., 1982).

Quando a podridão ácida ainda está na fase inicial, é difícil de diagnosticar os sintomas podendo ser confundidos com outras doenças, nomeadamente a podridão cinzenta. A partir do pintor, este fungo provoca o acastanhamento dos bagos, adquirindo uma coloração cinzento-escura, no entanto, a alteração dos bagos limita-se aos tecidos situados imediatamente abaixo da película, não se verificando a desintegração total da polpa como acontece na podridão ácida (Bisiach *et al*., 1986). Os fungos *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer* podem-se desenvolver em simultâneo com a podridão ácida, sobre os mesmos cachos, mas não sobre os mesmos bagos. Os bagos atacados por podridão ácida não são invadidos por aqueles agentes, embora o contrário possa acontecer (caso em que os agentes de podridão ácida beneficiam das microfissuras causadas pela *Botrytis cinerea*), as infecções pré – existentes daqueles fungos são inactivados: o ácido acético da polpa dos bagos atacados por podridão ácida, inibe a germinação dos esporos e o crescimento dos dois fungos, quer por contacto, quer por volatilização (Gravot *et al*.,2001).

Também se observam, embora mais raramente, uns amontoados mucosos esbranquiçados que não devem ser confundidos com os ovos de *Drosophila*. Ao nível das feridas dos bagos podres, estes ovos dão origem a larvas e pupas cuja presença, em grande número, nos bagos atacados, é um factor distintivo da podridão ácida, tal como a presença de dípteros adultos (Gravot *et al.,* 2001; Meroni *et al.,* 1996). Ao microscópio podem-se observar grandes quantidades de adultos, larvas e ovos de nemátodos (Gravot *et al.,* 2001) e de acordo com Lorrain & Romero (1999), trata-se de nemátodos saprófitas.

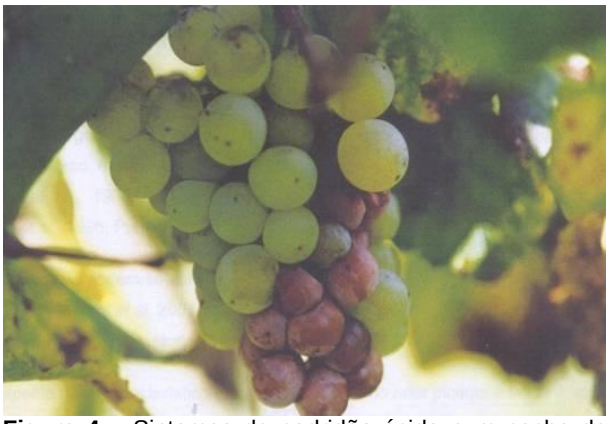

Figura 4 – Sintomas de podridão ácida num cacho da casta Chardonnay, na vinha da Região da Bairrada (Gomes, 2004).

Figura 5 – Sintomas de podridão ácida num cacho da casta Trincadeira Preta, na vinha do Instituto Superior de Agronomia, Vindima de 2008.

Figura 6 – Bagos esvaziados do seu conteúdo e a presença de Drosophila sp. na superfície da película, na vinha Instituto Superior de Agronomia, Vindima de 2008

1.6.3. Alteração da composição química dos vinhos

A podridão ácida das uvas é uma das preocupações actuais da viticultura e enologia. Não existem muitos estudos relativamente à influência de uvas afectadas pela podridão ácida na estabilidade e na qualidade dos vinhos, comparada com os estudos efectuados por vinhos afectados *Botrytis cinerea*.

A acção indirecta da podridão ácida resulta da modificação da composição dos bagos, em especial aumento da acidez volátil, devido à produção de ácido acético (uvas com 20% de ataque com podridão ácida podem apresentar um aumento de acidez volátil de 0,25g de ácido acético/litro) e da acidez total (para o mesmo nível de ataque, o aumento de

acidez total pode ser 0,25g de ácido tartárico/ litro). Verifica-se ainda, uma diminuição dos conteúdos em álcoois superiores, extracto seco e cinzas (Gomes, 2004).

Além disso, é possível constatar uma redução dos teores de açúcar, nos mostos, resultando vinhos com teores alcoólicos inferiores, ao mesmo tempo que ocorre um aumento da intensidade da cor, do acetato de etilo, do ácido urónico, do glicerol, do ácido galacturónico, do ácido pirúvico, do ácido múcico e às vezes, do ácido glucónico e das substâncias azotadas, embora também haja relatos da diminuição do azoto total (Guerzoni e Marchetti, 1987). De acordo com Torres (1998), nas castas Moscatel, a podridão ácida causa também um abaixamento do aroma varietal (devido aos álcoois terpénicos). Relativamente ao processo de vinificação constata-se alterações da composição das uvas quando afectadas pela podridão ácida, podendo esta afectar o crescimento das leveduras, durante a fermentação alcoólica e até mesmo das bactérias lácticas, durante a fermentação maloláctica (Sponholz, 1992). Até determinadas concentrações de ácido acético, poderão não ocorrer problemas com a cinética fermentativa, pois apesar da espécie de levedura dominante durante a vindima, ser diferente consoante as uvas estejam ou não atacadas por podridão ácida. No entanto, *Saccharomyces cerevisiae* poderá conseguir suplantá-la e assegurar o desenrolar da fermentação alcoólica até ao fim (Laurent, 1998). Laurent (1998) efectuou contagens de leveduras no decurso da fermentação alcoólica que demonstraram que:

- *Candida stellata* era maioritária (80 a 90 %) na vindima atacada por podridão ácida, mas as leveduras *Saccharomyces spp*. asseguravam o fim da fermentação alcoólica;
- Nas vindimas sãs, *Kloeckera apiculata* estava presente em 90% no início da fermentação alcoólica, mas depois *S. cerevisiae* passava a representar 90 e 100% da flora perto do fim da fermentação alcoólica.

Laurent (1998) afirma que se deve efectuar uma sulfitagem de 80 mg de SO_2/ l; uma boa inoculação de estirpes de *Saccharomyces spp*. no inicio bem como de bactérias no fim da fermentação, permite reduzir o tempo de latência e adiantar o inicio da fermentação maloláctica.

Para complementar estes trabalhos, Zoecklein (2000a) desenvolveu diversos estudos na Virgínia, com objectivo de descrever a influência da utilização de uvas afectadas pela podridão ácida na qualidade dos mostos. Tanto *Botrytis cinerea* como a podridão ácida apresentam uma influência na química dos vinhos, como descrito na Tabela 3.

É de salientar que nestes dois tipos de vinhos é frequente observar-se níveis elevados de ácido acético e láctico.

Tabela 3 – Comparação de mostos de vinhos da casta Riesling na Virgínia (Zoecklein, 2000a)

	Uvas Sãs	**Uvas afectadas por *Botrytis cinerea***	**Uvas afectadas por podridão ácida**
Brix	18,5	21	16,0
Acidez total (g/l)	8,0	6,5	5,0
pH	3,3	3,5	>3,4
Acido glucónico (g/l)	0,5	1-5	>0,5
Acido acético (g/l)	0	1,1	>1,5
Glicerol (g/l)	Vestigial	1-10	Vestigial
Etanol (%, v/v)	0	0-vestigial	>0,2%
Lacase (µg/ml)	Vestigial	0,1-8	vestigial até 0,5
Glucano (mg/l)	0	247	65

Tanto *Botrytis* como a podridão ácida reduzem os níveis de azoto disponíveis para o metabolismo das leveduras, para além disso os níveis de tiamina (vitamina B_1) e piridoxina (vitamina B_6) são esgotados. Por esta razão este autor sugere que os vinhos produzidos a partir de uvas danificadas com estas doenças devem ser suplementadas com azoto e vitaminas evitando assim os amuos de fermentação e uma possível formação de H_2S. Tal como outros fungos *Botrytis cinerea* produz lacase, que catalisa a oxidação dos compostos fenólicos, isso, combinado com a perda de aroma varietal é um problema causado pelas podridões (Zoecklein, 2000a). Os principais compostos fenólicos das uvas, o ácido cafeico e o ácido *p*-cumárico livres são esterificados com o ácido tartárico e transformados em quinonas pela lacase provocando a polimerização originando o escurecimento da uva, mais difícil de detectar em uvas tintas (Zoecklein, 2000a).

A lacase é resistente ao dióxido de enxofre, não sendo facilmente removida pela bentonite e, é activada na presença de álcool, por isso é importante a redução do tempo de pré-fermentação (Zoecklein, 2000a).

O ácido glucónico é considerado um indicador de contaminação das uvas, podendo afectar a qualidade a qualidade organoléptica do vinho (McCloskey, 1974). Sponholz e Dittrich (1985) apenas referem as bactérias acéticas como produtoras de ácido glucónico em vez dos fungos, Zoecklein (2000b) afirma que a presença de *Aspergillus, Botrytis* e *Penicillium* sp provoca a oxidação da glucose produzindo ácido glucónico que não é utilizado por leveduras nem por bactérias (Benda, 1984), podendo ser utilizado como indicador de podridão.

Num estudo mais recente Ramachandran *et al*. (2006) considera que o ácido glucónico é *produzido* por algumas espécies de bactérias e leveduras como *Pseudomonas savastanoi*, *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter methanolicus* e *Aureobasidium pullulans.* O aumento de ácido glucónico permite juntamente com o dióxido de enxofre reduzir a quantidade de SO_2 livre, levando ao aumento da dose de SO_2 necessária para proteger o vinho da oxidação e do ataque microbiano durante o armazenamento e envelhecimento (Peinado *et al*., 2009).

Ribereau-Gayon (1988), sugere que a proporção de glicerol para ácido glucónico indica a "qualidade" da podridão, quando esta proporção é elevada indicam podridão nobre e proporções mais baixas sugerem a podridão ácida. Para este autor, um dos maiores impactos da presença de podridão ácida nos vinhos é a formação de polissacáridos que originam problemas de clarificação, pois as pectinas são hidrolizadas pela poligalacturonases formando β-1,2 e 1,6-glucanas. No vinho o álcool etílico faz com que as cadeias de glucano se agreguem inibindo a clarificação e a filtração. Abaixo encontra-se uma tabela resumo sobre a incidência química de podridões em mosto de uvas.

Tabela 4 – Incidência química de diversas podridões no mosto/uva.

Qualidade da uva	Ácido acético (g/L)	Ácido glucónico (g/L)	Glicerol
Uvas sãs	0 (Zoecklein, 2000)	>0,5 (Peinado, 2009) 0,5 (Ribereau-Gayon, 1988)	Vestigial Zoecklein, 2000)
Podridão Nobre	<1 (Ribéreau-Gayon *et al*., 2006)	1/2 (Flanzy, 2000) 1,28/5,89 (McCloskey, 1974)	1-10 (Flanzy, 2000)
Podridão Cinzenta	<1,1 (Anónimo, 2009)	2,0/5 1/5 (Ribereau-Gayon, 1988)	<20 (Anómimo, 2009)
Podridão Ácida	0,3-12,4 (Guerzoni e Marchetti, (1986) <1,5 [2] <40(Ribéreau-Gayon *et al*., 2006)	<25 (Ribéreau-Gayon *et al*., 2006)	Vestigial (Zoecklein, 2000)

1.7. Estratégias de protecção

1.7.1. Estimativa do risco e tomada de decisão

Não existe um modelo que permita estimar os riscos de ataque da podridão ácida Gomes (*2004*) e de acordo com Paños (1998b), para efectuar a estimativa do risco da doença, devem-se observar os cachos, a partir da maturação, procurando feridas que apareçam nos bagos, e tentando localizar a presença de dípteros *Drosophila* spp. e do odor

a vinagre. As cepas mais vigorosas e com maior carga, existentes numa parcela, devem ser alvo de maior vigilância. Relativamente a *Drosophila* spp., também não existe um modelo de previsão de risco, pelo que o seu aparecimento é imprevisível (Gomes, 2004). Paños (1998a) refere um método que consiste na colocação de armadilhas com vinho, vinagre e polpa como atractivo. Estas armadilhas que deverão ser observadas regularmente, devem ser colocadas na vinha no início do pintor, ou seja, quando começa a aumentar o teor em açúcar dos bagos.

1.7.2. Meios de protecção

Os meios de protecção devem incidir sobre medidas que evitam tudo o que possa causar feridas nos bagos, recorrendo a todos os meios que possibilitem uma redução do vigor da vegetação e evitem uma folhagem muito densa, de forma a reduzir a humidade ao nível dos cachos. Deste modo, torna-se importante uma boa protecção fitossanitária relativa a *inimigos* que possam danificar a película dos bagos, sobretudo a partir do pintor, como seja o míldio, o oídio e a traça da uva. É importante também ter cuidado com as fertilizações azotadas e com a rega durante a maturação, com a condução e poda das videiras (efectuando inclusivé podas em verde que favoreçam uma boa ventilação da zona dos cachos) com a escolha dos porta-enxertos (não muito vigoroso, devem estar adaptados ao solo e apresentar sistemas radiculares profundos) e das castas (evitando, se possível, as mais sensíveis), de forma a evitar o amontoar de cachos e folhagem, conseguindo cachos de tamanho médio. O enrelvamento também poderá contribuir para a limitação da doença, através da redução do vigor da vinha (Laurent, 1998; Lorrain & Romero, 1999; Paños, 1998b).

Na opinião de Paños (1998b), o recurso a substâncias fitorreguladoras poderá apresentar vantagens para a produção de cachos menos compactos, contribuindo também para a selecção de clones dirigidos para a produção de cachos soltos de tamanho médio e com película resistente. Recentemente, na Suíça, foi utilizado uma hormona bioreguladora, a giberelina (GA_3), que ocorre naturalmente na uva, influenciando a morfologia do cacho estimulando o alongamento e a divisão celular, reduzindo assim a fecundação não deixando qualquer tipo de resíduos na vinha. Na viticultura, a aplicação de GA_3 deve coincidir com a floração para atingir os objectivos desejados. Os testes realizados durante quatro anos em Pinot Noir, mostra a redução de podridão cinzenta e da podridão ácida, sendo que os melhores resultados foram obtidos com doses de 50 e 100 ppm de GA_3, sem afectar negativamente a qualidade da uva e do vinho. Doses mais baixas (10 e 20 ppm), também tiveram efeito positivo na redução da podridão ácida, o que é proporcional à dose aplicada (Spring & Viret, 2009).

A realização de mondas de cachos convém ser efectuada antes do pintor ou, caso contrário, acompanhá-las da limpeza da parcela, no que respeita aos cachos caídos no solo (Torres, 1998). A presença de frutos em putrefacção, no solo ou nas plantas, deverá ser sempre de evitar, visto que podem contribuir para um foco de infecção (Paños, 1998a).

A aplicação de meios de protecção química contra a podridão ácida é muito limitada. Segundo Laurent (1998), nenhum dos fungicidas existentes para combater a podridão cinzenta tem qualquer acção sobre os agentes da podridão ácida, embora Paños (1998b) refira que as dicarboximidas permitam ligeiras diminuições da doença. Segundo Bisiach *et al*. (1986), a actividade destes fungicidas (ineficazes contra leveduras e bactérias) na redução da podridão ácida, resulta na eliminação de *Botrytis cinerea*, que causa feridas nos bagos. O mesmo papel é desempenhado pelos fungicidas anti-míldio e anti-oídio, relativamente, à redução das feridas causadas por estas doenças. Para além disso, não existe substâncias activas eficazes que se possam usar contra os agentes da podridão ácida (bactérias e leveduras). Bisiach *et al*. (1986), refere que os fungicidas do grupo das ftalimidas apresentam uma grande toxicidade relativamente a leveduras, permitindo uma boa redução da podridão ácida, mesmo em baixas concentrações, no entanto, a sua utilização depende dos resíduos que deixa no mosto, que é bastante elevada.

Sabe-se que a acção do cobre é eficaz contra os agentes das podridões, sendo importante a realização de um tratamento com fungicidas contendo cobre, que tem uma acção fungistática e bacteriostática, ainda não esclarecida, contra agentes da podridão ácida Meroni *et al*. (1996). Segundo Meroni *et al*. (1996), mostraram haver uma correlação entre o abandono da aplicação do cobre e o aumento da incidência da doença. Lorrain & Romero (1999) colocam a hipótese do cobre ter, ainda, um efeito tampão da humidade dos cachos, prejudicando assim, a actividade do nemátodo *Turbatrix aceti* e limitando a sua acção no alastramento da podridão ácida.

De acordo com Torres (1998), os tratamentos com cobre têm uma certa eficácia mas não asseguram uma protecção completa da vinha relativamente à podridão ácida. No entanto, os tratamentos com cobre poderão deixar resíduos sobre as uvas tratadas, tanto mais quanto maior for o número de tratamentos mas dependendo, sobretudo, do posicionamento do último tratamento relativamente à vindima. Todavia, parece que os resíduos encontrados nos mostos desaparecem, em grande parte, durante a fermentação alcoólica, não se detectando nos vinhos produzidos (Torres, 1998). Para Meroni *et al*. (1996) a adição de calda bordalesa parece ter, por vezes, uma acção desfolhamento ao nível da zona tratada, permitindo assim, um melhor arejamento dos cachos, sem necessidade de desfolha manual.

Laurent (1998), afirma que o combate directo aos dípteros do género Drosophila, vectores da doença e Delpuech (1993) pensa que deverão ser considerados e tratados como verdadeiras pragas, não só das culturas mas também da indústria alimentar, visando a sua redução através da aplicação de insecticidas. Como não existe nada homologado especificamente contra estes dípteros na vinha os ensaios realizados respeitaram as doses homologadas para a traça das uvas, utilizando organofosforados e/ou piretróides, no entanto, foi conseguida alguma redução da intensidade do ataque da podridão ácida, embora nem sempre muito significativa (Laurent, 1998).

Mas, segundo Paños (1998a), os insecticidas específicos contra dípteros não são muito eficazes (não atingindo larvas e pupas que se encontram dentro dos bagos e a sua acção é relativa e de curta duração) e as aplicações contra pragas como as traças dos cachos, embora contribuam para a redução da população de *Drosophila* spp., também não resolvem o problema definitivamente.

1.8. Enquadramento e objectivos do trabalho

Em enologia, é de conhecimento comum que uvas afectadas com podridão ácida originam vinhos de menor qualidade e de maior instabilidade microbiana. No entanto, não é claro o seu efeito real na fermentação vinária e na qualidade final dos vinhos produzidos.

O presente trabalho vem na sequência da investigação realizada no laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia, sobre a flora contaminante de uvas com podridão ácida desde 2003, tendo-se demonstrado a presença de leveduras de alteração de vinhos neste tipo de matéria-prima (Barata *et al*., 2008 a, b).

O objectivo global deste trabalho foi avaliar o efeito da utilização de uvas afectadas por podridão ácida nas fermentações vinárias e avaliar a qualidade final dos vinhos. Para a sua concretização foi realizado um conjunto de ensaios, englobados nas seguintes tarefas:

1. Realização de 5 ensaios de microvinificação com matéria-prima sã e com vários níveis de podridão;
2. Acompanhamento das fermentações das diferentes modalidades através da densidade, temperatura e acidez volátil no decorrer da fermentação;
3. Análise química convencional ao mosto de encuba, ao vinho após a fermentação maloláctica e estágio em garrafa;

4. Análise química das modalidades estudadas por Espectrometria de Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR) ao mostos de encuba e ao vinho após a fermentação maloláctica;
5. Análise microbiológica dos vinhos para pesquisa de leveduras totais, leveduras de alteração de vinhos, bactérias acética e lácticas após a fermentação maloláctica e estágio em garrafa;
6. Análise sensorial aos vinhos após a fermentação maloláctica e estágio de 6 meses em garrafa, recorrendo a um painel de provadores com objectivo de verificar a existência de diferenças qualitativas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Vindima

Os ensaios experimentais foram realizados durante a vindima de 2008, numa vinha experimental do Instituto Superior de Agronomia (ISA), situada na Tapada da Ajuda, Lisboa (Vinha do Almotivo, 38º 42´31. 40´´N de latitude e 9º 11´13. 62´´ O de longitude). O estudo incidiu nas parcelas referentes às castas tintas Trincadeira Preta e Cabernet Sauvignon, conduzidas segundo o sistema de condução monoplano ascendente.

2.1.1. Controlo de maturação

A marcação da data de vindima foi suportada recorrendo à determinação de alguns parâmetros analíticos, pH, ºBrix, grau provável e acidez total (análises realizadas no Laboratório Ferreira Lapa do ISA). A amostragem foi realizada uma vez por semana, analisando cerca de 300 bagos, de cada casta, recolhidos aleatoriamente ao longo da parcela da casta Trincadeira Preta e Cabernet Sauvignon.

2.2. Microvinificações de uvas com podridão ácida

Na Tabela 5 apresentam-se as diferentes modalidades de vinificação testadas, referindo a casta e a percentagem de uva utilizada em função do estado sanitário, na figura 7 encontram-se esquematizados os ensaios de microvinificação, realizados na Adega do ISA.

Tabela 5 – Percentagens e variedade de uvas utilizadas nos 5 ensaios de microvinificação realizados durante a vindima de 2008.

Casta	Sanidade	Modalidades de vinificação (% uvas)				
		*T_0	T_{30}	T_{50}	*C_{T0}	CT_{30}
		Testemunha	30% Podridão	50% Trincadeira	Testemunha	Testemunha
Trincadeira Preta	Sã	100	70	50	30	—
	Podridão ácida	—	30	50	—	30
Cabernet Sauvignon	Sã	—	—	—	70	70

*Testemunhas

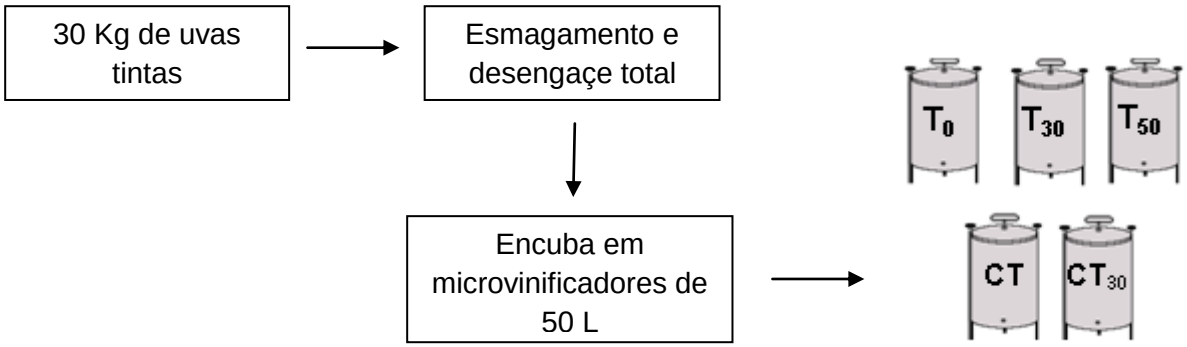

Figura 7 – Esquema dos ensaios de microvinificação realizados nas vindimas

2.2.1. Vinificações

As uvas foram transportadas em caixas de 20 Kg para a adega experimental do ISA e pesadas as quantidades necessárias para cada modalidade de microvinificação. Posteriormente, as uvas foram esmagadas e desengaçadas num esmagador desengaçador, foi medido o volume de mosto obtido (parte líquida) e pesados os engaços. Após o esmagamento e desengaçe total, procedeu-se à distribuição dos mostos e das massas correspondentes a um total de 40 Kg de uva por modalidade em microvinificadores de capacidade de 50 L, seguindo-se a desinfecção dos mostos com a adição de 50 mg/ L de metabissulfito de potássio (MK).

Após a encuba, os mostos foram deixados à temperatura ambiente durante um período de aproximadamente 18 horas em maceração pelicular pré-fermentativa.

2.2.2. Levedura de fermentação inoculada

Neste trabalho foi utilizada uma estirpe de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ISA 1000) pertencente à colecção de leveduras do Laboratório de Microbiologia do ISA, isolada de um fermento comercial (Fermivin®, DSM, Delft, The Netherlands).

2.2.3. Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado a partir de três ansadas de uma cultura fresca obtida após incubação a 25ºC em placa de meio de cultura genérico GYP (composto por glucose 20g/L (Merck, Darmstadt, Germany), extracto de levedura 5g/L (Oxoid, Hampshire, UK), peptona 5g/L (Oxoid) e agar 20g/L a pH 6), durante 24-48h. A biomassa fresca inoculada num balão de Erlenmayer de 3000 mL contendo meio de cultura GYP líquido.

2.2.3.1. Avaliação da viabilidade celular e cálculo do volume de inóculo

Todos os ensaios foram inoculados com uma concentração de 10^6 cel/ mL da estirpe referida em 2.2.2. A quantificação do número de células totais por mL de cada ensaio foram determinadas por contagem directa das células em hemocitómetro (Câmara de Neubauer), após coloração com azul metileno. Para tal, foi utilizada uma técnica referida por Thomas *et al*., (1978), adaptada de Fink e Kühler, a seguir descrita.

Retiraram-se 500 µl de inóculo que foram introduzidos num tubo Eppendorf contendo 500 µl de uma solução de coloração, composta por 0,01% (p/v) de azul metileno (Merck) e 2% (p/v) de citrato de sódio (Sigma), pH 7,6. A mistura foi homogenizada num vortex, deixando-se em repouso durante 5 minutos. De seguida, esta mistura foi diluída de forma a encontrar a diluição adequada que permitisse efectuar uma contagem de células numa câmara de contagem. Com auxílio de uma micropipeta (Gilson), retirou-se uma alíquota da diluição adequada, a qual foi introduzida sob a superfície da câmara de contagem.

Neste método, as células viáveis são contabilizadas por observação microscópica, apresentando-se incolores, ao contrário das células não viáveis, que surgem coradas de azul.

2.2.4. Fermentação dos mostos

As modalidades em estudo foram inoculadas com o inóculo preparado anteriormente, descrito 2.2.3. O volume de inóculo a adicionar em cada ensaio foi determinado de acordo com o descrito em 2.2.3.1. Todos os microvinificadores foram inoculados com uma concentração de 10^6 cel/mL da estirpe de levedura referida em 2.2.2.

A fermentação das modalidades em estudos foi acompanhada por leituras bi-diárias da massa volúmica (utilizando um mostímetro) e de temperatura (ver Anexo 1), efectuando-se, ao longo da fermentação remontagens manuais bi-diárias das massas. Para a avaliação da produção de ácido acético durante as fermentações, foram retiradas diariamente amostras para a determinação da acidez volátil expressa em ácido acético (NP 2140) ao longo de toda a fermentação. Visto que algumas modalidades apresentavam uma percentagem mais elevada de álcool foi necessário fazer um suplemento com 50 mg/L de difosfato de amónio (DAP), sempre que se verificou um abrandamento na fase final da fermentação.

2.2.5. Fim de fermentação

Durante a fermentação, as películas e as graínhas encontravam-se em contacto com o mosto permitindo a extracção de componentes da cor, bem como outros compostos. Após a fermentação alcoólica os vinhos foram prensados utilizando uma prensa hidráulica e foi realizada a primeira transfega dos vinhos, estes foram colocados em garrafões de vidro de 5, 10 e 20 litros.

2.2.6. Fermentação maloláctica

A fermentação maloláctica (FML) ocorreu espontaneamente e à temperatura ambiente para todas as modalidades excepto na amostra T50, onde foi necessário recorrer à inoculação de bácterias lácticas utilizando um fermento comercial (Enoferm), seguindo criteriosamente as instruções dadas pelo fabricante.

No fim da FML, foi feita a segunda transfega, contabilizando o volume de vinho limpo e a quantidade de borra, em seguida procedeu-se á correcção do sulfuroso com 40 mg/L de MK antes do engarrafamento. Os vinhos foram engarrafados em garrafas de 0,75 L ficando em estágio durante 6 meses na adega experimental do ISA.

2.3. Determinações analíticas

As modalidades em estudo foram sujeitas a uma análise química convencional ao mosto de encuba, ao vinho em fim de fermentação e após seis meses em estágio. Estas análises realizaram-se no Serviço de Análises do Laboratório de Enologia do Departamento de Agro-Indústrias e Agronomia Tropical (DAIAT) no ISA, tendo sido determinados os seguintes parâmetros analíticos: massa volúmica a 20ºC (ρ_{20}), teor alcoólico volumétrico a 20ºC (NP 2143), acidez total expressa em ácido tartárico (NP 2139), acidez volátil expressa em ácido acético (NP 2140), sulfuroso (SO_2) livre e total (NP 2220), açúcares redutores (NP 2223), intensidade e tonalidade da cor (O.I.V., 1990), índice de polifenóis totais determinado pelo produto da absorvância a 280nm pelo factor de diluição (Ribéreau- Gayon, 1970), antocianinas totais pela descoloração pelo bissulfito de sódio (Ribéreau-Gayon, 1965) e pesquisa da fermentação maloláctica (FML).

Foram ainda, realizadas análises complementares ao mosto, vinho em fim de fermentação e vinho após 6 meses de estágio pelo Serviço de Análises da Adega Cooperativa de Borba por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR), que permite a quantificação numa só análise, vários parâmetros de

maturação e sanidade das uvas. O produto GrapeScan, permite analisar, em cerca de 1 minutos os seguintes parâmetros: glucose/frutose (g/L), grau Brix, acidez total expressa em ácido tartárico (g/L), pH, ácido tartárico (g/L), ácido málico (g/L), acidez volátil expressa em ácido acético (g/L), amónia (mg/l), alfa amino azoto (mg/L) azoto assimilável total (mg/L), potássio (mg/L), índice podridão cinzenta, índice podridão ácida. Trata-se de um método de análise indirecto, sendo necessária a calibração para todos os parâmetros a analisar, esta por sua vez deve ser ajustada à matriz de mosto ou do vinho a analisar.

2.4. Análises microbiológicas

No final da FML e após o estágio de 6 meses em garrafa, devidamente corrigido com sulfuroso e engarrafado, foi retirada uma garrafa de 0,75 L das cinco modalidades em estudo e procedeu-se a análise microbiológica da flora de leveduras totais, o despiste da flora de leveduras de alteração, *Dekkera bruxellensis* e *Zygossacharomyces*, e contaminação por bactérias lácticas e acéticas.

2.4.1. Meios de cultura utilizados

Para a contabilização de leveduras totais presentes, recorreu-se ao uso do meio GYP com bifenil (0,5g/L) (descrito no ponto 2.2.3). Para a detecção de leveduras de alteração dos vinhos foram usados meios selectivos e diferenciais designados por *Dekkera/Brettanomyces* Differential Medium (DBDM), descrito por (Rodrigues *et al*., 2001) e *Zygosaccharomyces* differential médium (ZDM) descrito por (Schuller *et al*., 2000) no despiste de *Dekkera/Brettanomyces* e *Zygossacharomyces,* respectivamente. Para a quantificação de bactérias lácticas e acéticas presentes nas modalidades em estudo foram utilizados meios de cultura líquidos, Mann Rogosa Sharpe, (52g/L MRS, Oxid, 20g Agar-Agar, depois de esterilizar preparar a solução de L-cistina 0,5g/mL com 2,5g L-cistina e 5 mL água desmineralizada em seguida esterilizar por filtração de membrana 0,2µm e armazenar no frigorífico) e GY Penicilina e Pimaricina (10g extracto levedura, 50g glucose, acertar pH 4,5, 27g agar-agar, 1000ml água desmineralizada), após a esterilização preparar as soluções stock de penicilina 3000U/mL (0,0188g penicilina, 10 mL água desmineralizada, esterilização por filtração em membrana 0,20µm e adicionar 1 mL de solução estéril para 1 mL de meio e armazenar no frigorífico) e solução Pimaricina/Natamicina (100 ppm) igual Delvocid (200 ppm) (0,2g Delvocid, 5 mL DMSO, adicionar 5 mL preparados directamente a 1 mL de GY esterilizados) respectivamente.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120ºC durante 15 minutos e vertidos em placas de petri no caso dos meios de cultura sólidos relativamente, aos meios de cultura líquidos foram vertidos em tubos apropriados para este tipo de análise.

2.4.2. Quantificação dos microrganismos após a F.M.L

As garrafas contendo as amostras de vinho em estudo, foram abertas em condições de assépsia. A quantificação da flora total presente nos vinhos foi efectuada através da contagem de colónias em placas, método que permite quantificar o número de unidades formadoras de colónias (UFC/mL), recorrendo a diluições. Neste caso foi apenas necessário duas diluições (10^{-1} e 10^{-2}) em tubos contendo 9 mL de solução de Ringer estéril. Esta contagem foi realizada por espalhamento de 0,1 mL de vinho ou da diluição apropriada em meio GYP com bifenil (em duplicado). As placas de GYP com bifenil foram posteriormente colocadas invertidamente na estufa a 25ºC e os resultados anotados ao fim de 5 dias, as colónias foram examinadas visual e microscopicamente.

Para a quantificação das colónias crescidas nos meios de cultura selectivos e diferencias, DBDM e ZDM, foi efectuada com recurso à de filtração de membrana. Foram Filtrados em duplicado, 1 mL, 10 mL e 100 mL de cada amostra, em membrana de 0,22 µm de poro (Millipore). Os filtros foram colocados nas placas com meio de cultura DBDM e ZDM, respectivamente estas foram, em seguida as placas foram colocadas invertidas na estufa a uma temperatura de 25ºC, sendo o crescimento acompanhado ao longo do tempo e os resultados anotados ao fim de 12 dias, as colónias foram examinadas visual e microscopicamente.

Para a avaliação da existência de bactérias acéticas e lácticas nas modalidades em estudo recorreu-se à técnica do Número Mais Provável (N.M.P), este método consiste em fazer um número de diluições suficientes da amostra até à extinção. As amostras foram inoculadas em triplicado em meio MRS e meio GY líquido. Para cada uma das amostras de cada vinho, foram inoculados os seguintes volumes: 1 mL de vinho para 3 tubos contendo (5 mL de meio de cultura MRS e 3 mL de meio GY) e 1 mL de uma série de diluições decimais de cada amostra, desde 10^{-1} a 10^{-4} (usando tubos com 9 mL de solução de Ringer estéril), para 3 tubos contendo cada um dos meios de cultura referidos. As amostras foram incubar na estufa a 30ºC durante 5 dias

O N.M.P. obteve-se directamente a partir de uma tabela (ver anexo1), em função de um número de três algarismos representativos do número de tubos positivos de uma série de três diluições ordenadas e consecutivas, correspondendo a mais concentrada, ao

algarismo das centenas. A selecção das três diluições definidoras depois número referido (número característico), foi realizada aplicando aos resultados experimentais, um conjunto de regras definidas pelo método (anexo 1).

A leitura dos resultados consiste em contar, para cada diluição, o número de tubos positivos. Este número permite a entrada em tabelas estatísticas, designadas por tabelas estatísticas de Migrada que fornece o NMP de microrganismos.

Este método é útil na contagem de microrganismos que não crescem em meio de cultura sólida mas também em contagem de bactérias que crescem em meios líquidos diferenciados.

2.4.3. Quantificação dos microrganismos após 6 meses de estágio em garrafa

Para esta análise foi decidido recorrer a filtração de membrana para a quantificação da flora total, leveduras de alteração crescidas em meio de cultura DBDM e ZDM. As garrafas de vinho contendo as amostras de vinho a analisar, foram abertas em condições de assepsia. Foram filtrados em duplicado 1 mL, 10 mL e 100 mL de cada amostra de vinho, em membrana de 0,22 µm de poro (Millipore). Para a contabilização da flora total a membrana foi colocada nas placas com meio de cultura GYP com bifenil, para avaliar a presença de leveduras do género *Dekkera bruxelensis* e *Zygosaccharomyce* a membrana foi colocada em placa DBDM e ZDM respectivamente

As placas foram colocadas invertidas em estufa a uma temperatura de 25ºC, sendo o crescimento acompanhado ao longo do tempo e os resultados anotados ao fim de 12 dias no caso das leveduras crescidas nos meios de cultura selectivos e diferencias (DBDM e ZDM) e sensivelmente 5 dias depois no caso das leveduras totais, as colónias foram examinadas visual e microscopicamente. Relativamente, às bactérias acéticas e lácticas procedeu-se da mesma maneira ao descrito no ponto 2.4.2.

2.4.4. Isolamento e purificação da flora de leveduras após F.M.L e estágio em garrafa

A partir dos isolados obtidos nos diferentes meios de cultura sólidos utilizados, foram observados e seleccionados os diferentes tipos morfológicos das colónias representativas da biodiversidade encontrada.

Para cada modalidade em estudo, foram purificadas os vários isolados através da realização de placas de isolamento contendo meio GYP sólido (descrito no ponto 2.2.3.).

2.4.5. Identificação dos isolados de leveduras obtidas nas análises microbiológicas

Após a purificação dos isolados obtidos em 2.4.4., os mesmos foram enviados para o serviço de identificação de leveduras do Laboratório de Microbiologia do ISA. A identificação foi realizada recorrendo ao método molecular de análise por PCR-RFLP da região do gene 5.8S-ITS do rRNA das leveduras (Esteve- Zarzoso, *et al*., 1999).

2.5. Análise Sensorial

2.5.1. Análise sensorial antes da FML

A primeira análise sensorial foi realizada em prova cega por um painel de 8 provadores, numa sala de provas localizada no laboratório do DIAP. Foi elaborada uma ficha de prova onde se encontravam descrito alguns atributos utilizados para a caracterização de cada um dos vinhos tintos foi a seguinte: cor (intensidade), aroma (intensidade, qualidade, equilíbrio) gosto (intensidade, qualidade, equilíbrio, corpo, persistência, fim de prova) e apreciação global. Para a avaliação dos atributos cor, aroma e gosto foi utilizado uma escala numérica contínua (1 a 5), relativamente, à apreciação global utilizou-se uma escala hedónica crescente de 0 a 20 (ficha de prova em Anexo 2). A análise estatística foi feita recorrendo ao teste de distribuição simples t-Student ($p<0.05$) e as somas parciais de cada um dos atributos.

2.5.2. Análise sensorial após seis meses de estágio

Após seis meses de estágio em garrafa os vinhos foram sujeitos a nova análise sensorial. Esta análise foi realizada em prova cega utilizando um painel de 15 provadores, este ensaio foi realizado na sala de provas do DIAP. Para esta prova foi elaborada nova ficha de prova na qual os atributos utilizados para a caracterização de cada um dos vinhos foram os seguintes: cor (intensidade), aroma (intensidade, limpeza), gosto (intensidade, limpeza, equilíbrio, corpo, persistência, fim de prova) e apreciação global (ficha de prova em Anexo 3). A avaliação dos atributos cor, aroma e gosto foi feita recorrendo a uma escala numérica crescente e contínua (1 a 5), quanto à apreciação global utilizou-se uma escala hedónica crescente de 0 a 20 (ficha de prova em Anexo 2). O tratamento estatístico foi realizado utilizando o teste t-Student ($p<0,05$).

Nesta fase, os vários vinhos foram sujeitos a outro exercício sensorial utilizando o mesmo painel de 15 provadores, para cada vinho provado o provador teria de associar ao nível do aroma uma ou mais características gerais, nomeadamente, a característica floral, frutado, complexo, incaracterístico, maçã, podre, volátil, cola, químico e outros.

3. Resultados e Discussão

3.1. Controlo de maturação

O controlo de maturação foi realizado nas parcelas das castas Trincadeira Preta e Cabernet Sauvignon da vinha do Almotivo localizada no ISA conduzidas pelo sistema de condução monoplano ascendente. Este controlo foi executado recorrendo à determinação de alguns parâmetros químicos. Nas tabelas 6 encontram-se os resultados dos parâmetros determinados, com base nestes resultados foi possível acompanhar a maturação das uvas e determinar a marcação da vindima para o dia 15 Setembro de 2008.

Tabela 6 – Controlo de maturação da casta Trincadeira Preta e Cabernet Sauvignon.

Castas	Data	pH	º Brix	Álcool provável (% v/v)	Acidez total (g/L)
Trincadeira Preta	**25-Ago**	3,22	19,3	10,6	5,8
	01-Set	3,36	20,0	11,0	5,6
	04-Set	3,48	21,4	11,9	4,8
	08-Set	3,43	20,8	11,5	4,7
Cabernet Sauvignon	**15-Set**	3,45	21,8	12,1	4,7
	04-Set	3,36	21,2	11,8	7,0
	08-Set	3,35	22,6	12,7	5,9
	15-Set	3,36	23,3	13,1	6,3

3.2. Rendimentos de vindima

O rendimento foi determinado através de um balanço de massas, com objectivo de determinar o efeito das uvas afectadas por podridão no rendimento de uva e de vinho. A tabela 7 mostra como foram obtidas as misturas de uvas com diferentes percentagens de podridão ácida.

Tabela 7 – Rendimento da vindima de 2008

Parâmetro	100% Trincadeira			70% Cabernet + 30% Trincadeira	
	Testemunha	30% Podridão	50% Podridão	Testemunha	30% Podridão
	T_0	T_{30}	T_{50}	CT_0	CT_{30}
Peso total de uvas (Kg)	30	30	30	30	30
- Trincadeira Sã (Kg)	30	21	15	9	-
- Trincadeira Podre (Kg)	-	9	15	-	9
- Cabernet são (Kg)	-	-	-	21	21
Peso de engaço (g)	1178	1400	1559	1195	1291
Mosto de gota (L)	5,0	4,5	2,9	4,8	3,6
Rendimento % (engaço/uva total)	3,9	4,7	5,2	4,0	4,3

A análise da tabela 7 permite constatar que nas modalidades T_{30}, T_{50} e CT_{30} ocorreu uma diminuição do mosto obtido sendo necessário um maior número de cachos para produzir a mesma quantidade de vinho (30 L), por esta razão a quantidade de engaços extraídos foi superior influenciando o rendimento engaço/uva proporcional ao aumento da podridão

3.3. Fermentações Vinárias

As fermentações foram acompanhadas realizando-se leituras bi-diárias da massa volúmica e temperatura dos mostos. Para cada ensaio efectuou-se a análise da quantidade de açucares residuais presentes no vinho, no momento em que se obtinham duas leituras idênticas de densidade no final de fermentação, decidindo assim o momento da primeira transfega.

A primeira transfega foi realizada a partir do momento em que o vinho produzido apresentou um valor de densidade inferior ou igual a 997. As figuras 8 e 9 revelam a evolução da densidade, temperatura e da acidez volátil ao longo da fermentação, verificando-se uma temperatura média de fermentação de 24ºC em todos os ensaios. A acidez volátil foi aumentando ao longo da fermentação, não influenciando o decorrer da fermentação (Anexo 3).

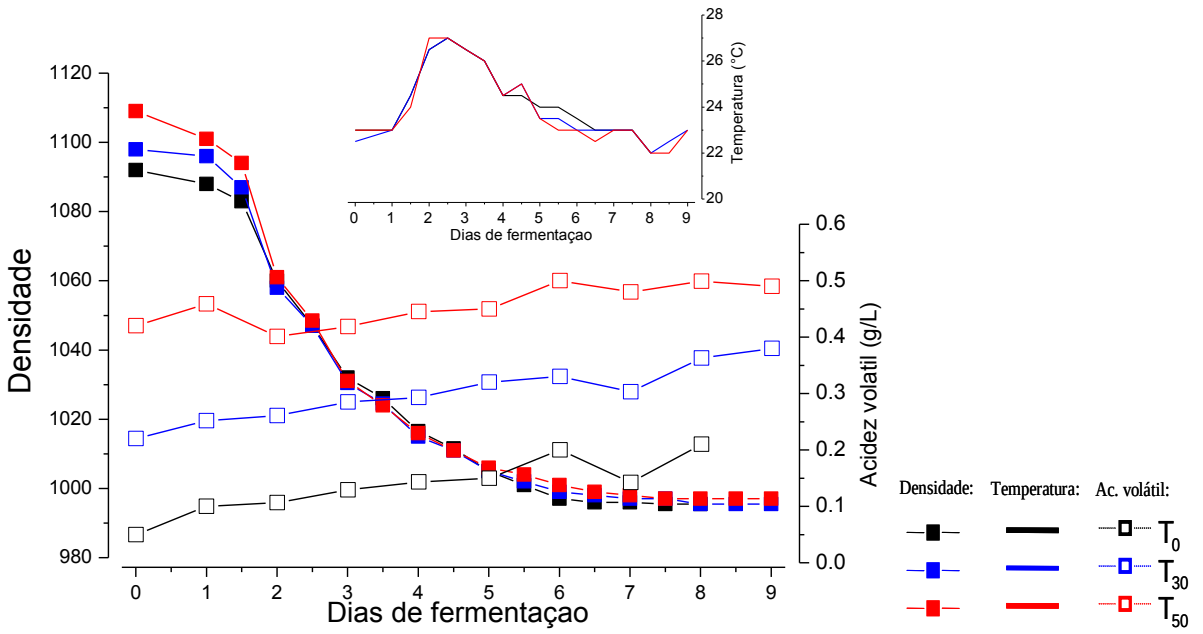

Figura 8 – Evolução da massa volúmica, temperatura e acidez volátil dos mostos das modalidades T_0 T_{30} e T_{50}

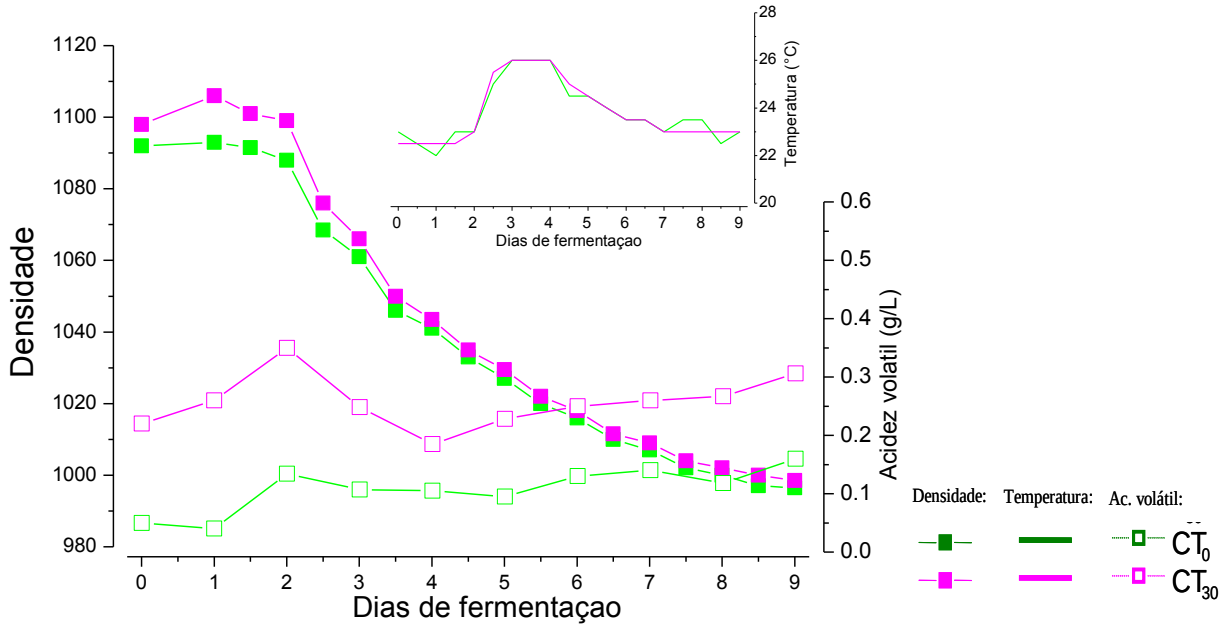

Figura 9 – Evolução da massa volúmica, temperatura e acidez volátil dos mostos das modalidades CT_0 e CT_{30}

3.4. Análises químicas

Para melhor compreender o efeito da introdução de uvas afectadas por podridão na ácida na vinificação, as modalidades em estudo foram sujeita a uma análise química convencional e por análise do FTIR, nos mostos de encuba, após a FML e estágio de 6 meses em garrafa.

3.4.1. Análise química ao mosto

Nas tabelas 8 encontram-se os valores dos parâmetros químicos dos mostos de determinados por análise convencional e por análise do FTIR na vindima de 2008.

É importante referir que o equipamento foi calibrado de acordo com os mostos e uvas da Adega Cooperativa de Borba.

A análise destes resultados permite avaliar a influência da adição de uvas com podridão ácida nos valores de alguns parâmetros químicos como a intensidade de cor, antocianas totais, fenóis totais, verificando-se um aumento destes parâmetros é proporcional ao aumento da percentagem de podridão presente nos mostos. A adição crescente de uvas com podridão ácida, implicou uma crescente concentração de açúcar nos mostos e, por consequência, do grau alcoólico provável, quando comparado com as modalidades testemunha compostas exclusivamente por uvas sãs. Este resultado vem contrariar a

bibliografia que afirma uma redução dos teores de açúcar, nos mostos, resultando vinhos de teores alcoólicos inferiores (Guerzoni e Marchetti, 1987). Por sua vez, a análise do parâmetro acidez volátil e acidez total permitiu observar um aumento proporcional à quantidade de podridão ácida presente no mosto.

Tabela 8 – Análises convencionais e por FTIR dos mostos das modalidades realizadas na vindima de 2008

Parâmetro	100% Trincadeira			70% Trincadeira +30% Trincadeira	
	Testemunha	30% Podridão	50% Podridão	Testemunha	30% Podridão
	T_0	T_{30}	T_{50}	CT_0	CT_{30}
Brix [a]	21,4	22,4	23,8	21,3	22,7
Densidade [b]	1092	1098	1109	1093	1106
Grau provável [b]	11,8	13	14,2	11,8	13,5
pH [a]	3,52	3,29	3,19	3,39	3,31
Ac. total (g/L) [a]	4,26	4,54	5,72	3,94	4,35
Ac. volátil (g/L) [a]	0	0,1	0,33	0	0,07
Ácido Tartárico (g/L) [a]	4,7	2,4	1,8	2,8	1,8
Ácido Málico (g/L) [a]	3,4	3,2	3,3	3,3	3,2
SO_2 total (mg/L)[b]	110	98	104	108	134
SO_2 livre (mg/L)[b]	49	13	6	52	52
Glucose/Frutose (g/L)[a]	214	223	235	208	223
Alfa Amino Azoto (mg/L)[a]	90	79	105	67	65
Azoto Assimilável Total (mg/L)[a]	253	230	270	223	206
Fenóis totais [b]	18,6	20,2	23,9	14,8	18,4
Antocianas [b]	314	357	390	297	361
Intensidade Cor[b]	1,56	5,85	9,09	0,92	1,52
Índice Podridão Cinzenta (0-60)[a]*	29	45	48	31	47
Índice Podridão Ácida (0-30)[a] *	3	6	13	4	6

[a] Análise por FTIR; [b] Análise Convencional; * Desconhecido o parâmetro utilizado

O resultado obtido pelo FTIR constata-se um decréscimo de ácido tartárico e ácido málico, à medida que aumenta a quantidade de uvas podres adicionadas. É de notar que através desta análise não se constatou a diminuição de azoto assimilável proporcional ao aumento da introdução de uvas com podridão ácida, como referido por Zoecklein (2000a).

Por outro lado, os resultados mostraram que o parâmetro "índice de podridão ácida e "índice de podridão cinzenta" obtido pelo FTIR permite determinar os diferentes níveis de podridão ácida presentes nas diferentes modalidades proporcional ao aumento de uvas podres, é de referir que de acordo com a calibração que a Adega Cooperativa de Borba

calcula para a matriz das suas uvas, consideram que as uvas têm mau estado sanitário quando apresentam valores para o Índice Podridão Cinzenta > 30, ou quando o Índice de Podridão Ácida é >10 e o índice de actividades fermentativas é >15. De acordo, com Adega Cooperativa de Borba para este último índice, a casta Cabernet Sauvignon, nas suas condições, apresenta normalmente valores altos, em virtude das suas características naturais e da maior quantidade de leveduras indígenas que possui, quando comparada com outras castas.

3.4.2. Análise química ao vinho após Fermentação alcoólica

Após a fermentação alcoólica os vinhos em estudo foram sujeitos a nova análise química convencional e por FTIR, os resultados encontram-se resumidos na tabela 9.

Tabela 9 – Análise por FTIR e convencional dos vinhos finais após a fermentação alcoólica.

Parâmetro	100% Trincadeira			70% Cabernet Sauvignon+30% Trincadeira	
	Testemunha	30% Podridão	50% Podridão	Testemunha	30% Podridão
	T_0	T_{30}	T_{50}	CT_0	CT_{30}
Massa volúmica[a]	0,9904	0,9922	0,9919	0,9906	0,9910
Teor alcoólico (%)[a]	12,5	13,5	14,9	13,0	14,3
pH[a]	3,38	3,3	3,35	3,34	3,32
Acidez Total (g/L)[a]	5,12	6,26	7,00	5,95	6,60
Acidez fixa (g/L)[b]	5,9	6,9	6,8	6,7	7,2
Acidez volátil (g/L)[a]	0,00	0,21	0,40	0,05	0,21
Ácido Málico (g/L)[a]	2,0	2,1	2,2	2,4	2,4
Ácida Láctico (g/L)[a]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Açucares (g/L)[a]	1,7	4,3	4,3	1,2	2,4
Extracto Seco (g/L)[a]	23,6	30,2	33,1	25,7	30,4
Sulfuroso Total (mg/L)[b]	78	78	98	88	88
Sulfuroso Livre (mg/L)[b]	16	23	19	23	23
Índice de Polifenois totais[a]	30,2	32,8	39,7	36,7	40,2
Fenois totais[b]	50,2	51	56,8	48,1	50
Antocianas (mg/L)[b]	466	478	510	473	475
Intensidade cor[a]	24,9	20,4	26,0	26,0	23,9
Pesquisa da F.M.L[b]	A dar-se	A dar-se	A dar-se	A dar-se	A dar-se

[a] Análise por FTIR; [b] Análise Convencional

Os resultados obtidos permitem avaliar o efeito das uvas afectadas por podridão ácida nos vinhos finais, pela análise da tabela 9 verifica-se os resultados obtidos nas

determinações analíticas dos mostos, representados na tabela 8, no que diz respeito ao maior, teor de açúcares, grau alcoólico, ao teor de antocianas, à quantidade de fenóis totais e índice de polifenois totais nos vinhos pertencentes às modalidades com podridão ácida. De realçar que apesar dos valores mais elevados de acidez volátil iniciais pertencerem aos mostos com podridão, após a fermentação alcoólica, os vinhos finais não apresentaram um aumento significativo no valor deste parâmetro. É de notar que os valores dos parâmetros antocianas, intensidade da cor e fenóis totais aumentaram proporcionalmente à percentagem de uvas podres introduzidas nas modalidades em estudo, apresentando valores superiores na fermentação alcoólica comparado com os valores obtidos na análise química aos mostos tabela 8.

É de notar um aumento do extracto seco nas modalidades com uvas podres, este resultado pode ser explicado devido ao facto das uvas com podridão desidratarem e concentrarem as quantidades de matérias sólidas. Constata-se que o valor de pH encontram-se dentro dos parâmetros ideais para a ocorrência da FML, quando se procedeu a esta análise os vinhos ainda não tinha iniciado a FML, por esta razão a quantidade de ácido láctico nas modalidades é inexistente. Relativamente, ao ácido málico verifica-se um aumento proporcional ao aumento da concentração de uvas com podridão ácida, mas apenas nas modalidades constituídos por Trincadeira.

Após a FML os vinhos foram sujeitos a uma nova análise química por FTIR, os resultados encontram-se na tabela 10**.**

Tabela 10 – Análise por FTIR dos vinhos finais após a FML.

Parâmetros	100% Trincadeira			70% Cabernet Sauvignon+30% Trincadeira	
	Testemunha	30% Podridão	50% Podridão	Testemunha	30% Podridão
	T_0	T_{30}	T_{50}	CT_0	CT_{30}
Massa volúmica	0,9900	0,9911	0,9917	0,9905	0,9911
Teor alcoólico (%)	12,3	14,1	14,6	11,9	13,3
Extracto seco (g/L)	21,7	28,7	31,6	22,1	27,0
Açucares (g/L)	1,6	3,2	4,1	0,7	2,0
Ácidez Total (g/L)	3,96	5,30	5,94	4,32	5,25
Ac. volátil (g/L)	0,10	0,36	0,45	0,11	0,33
pH	3,63	3,54	3,54	3,57	3,53
Acido Málico (g/L)	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3
Acido Láctico (g/L)	0,8	0,7	0,7	0,8	0,7
Índices Polifenois totais	33,5	35,9	39,4	36,5	39,7
Intensidade cor	17,0	15,9	20,1	16,8	17,5

Pela análise da tabela verifica-se um aumento do extracto seco, açúcares proporcional ao aumento de uvas afectadas por podridão ácida, no entanto ocorre uma diminuição destes parâmetros quando comparados com análise elaborada anteriormente, representada na tabela 9. É de realçar o aumento da acidez volátil e de polifenois totais com a introdução de uvas podres nas modalidades em estudo e o aumento desta relativamente a análise anterior (tabela 9). É possível também constatar um aumento do pH dos vinhos após a FML, da quantidade de ácido láctico nos vinhos, não sendo este aumento muito significativo, verifica-se também uma diminuição pouco significativa do ácido málico relativamente á análise anterior, é de notar uma diminuição significativa da intensidade da cor após a FML, possivelmente devido as amostras estarem congeladas durante alguns meses até se proceder à análise química.

3.4.3. Análise química ao vinho após 6 meses de estágio

Os vinhos em estudo permaneceram em estágio de garrafa durante 6 meses, após este período de tempo as modalidades em estudo foram novamente sujeitas a uma análise química convencional e por FTIR, de modo a compreender a evolução destes vinhos produzidos a partir de uvas afectadas por podridão ácida.

Na tabela 11 encontram-se os resultados obtidos, e permitiu verificar a ocorrência de algumas alterações químicas, comparativamente a análise feita após a FML, apresentada na tabela 10.

Pela observação da tabela 11 encontram-se resumidos os valores obtidos pela análise química por FTIR e convencional após 6 meses de estágio em garrafa. Pode-se verificar um aumento do grau alcoólico, extracto seco, açucare e polifenois totais dos vinhos, á medida que aumenta a percentagem de uvas podres introduzidas nas modalidades em estudo. A acidez volátil aumenta em todas as modalidades sendo o aumento mais significativo na modalidade T_{50}, quando comparada com análise feita no fim da fermentação alcoólica, representada na tabela 10, também se verificou que a acidez total e fixa de todas as modalidades descritas diminuíram, comparadas com a análise anterior (tabela 9), é de notar que nas modalidades que possuem na sua composição uvas podres apresentam uma maior acidez total e fixa comparada com as respectivas testemunhas.

Esta análise permitiu demonstrar que os valores de sulfuroso livre e total aumentaram ao fim de 6 meses de estágio quando comparados com os resultados anteriores (tabela 9), estes valores podem ser explicados devido ao tratamento feito com MK antes de se proceder ao engarrafamento do vinho.

De realçar que os valores dos fenóis totais diminuíram ao fim de seis meses de estágio, mas nas modalidades com podridão e quanto maior a percentagem de uvas podres maior foi o valor de fenóis. Por sua vez as antocianas aumentaram ao fim de 6 meses em estágio quando comparados com a última analise química (tabela 9) e, mais uma vez, o aumento deste parâmetro foi proporcional à introdução de uvas podres nos vinhos. No entanto, é de mencionar uma diminuição mais acentuada da intensidade da cor, provavelmente devido as amostras encontrarem-se congeladas durante alguns meses até se proceder a esta análise química final. É possível observar que a modalidade T_{50} demorou 80 dias a completar a FML, não sendo possível dar-se espontaneamente como as restantes amostras.

Tabela 11 – Análise química por FTIR e convencional dos vinhos após 6 meses de estágio.

Parâmetro	100% Trincadeira			70% Cabernet Sauvignon+30% Trincadeira	
	Testemunha	30% Podridão	50% Podridão	Testemunha	30% Podridão
	T_0	T_{30}	T_{50}	CT_0	CT_{30}
Massa volúmica[a]	0,9905	0,9907	0,9919	0,9906	0,9913
Teor alcoólico (%)[a]	11,4	13,3	13,9	12,1	12,8
pH[a]	3,62	3,52	3,54	3,57	3,55
Acidez Total (g/L)[a]	3,70	4,85	5,53	4,47	5,02
Acidez fixa (g/L)[b]	4,0	4,9	5,4	4,9	5,3
Acidez volátil (g/L)[a]	0,12	0,30	0,46	0,15	0,33
Ácido Málico (g/L)[a]	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3
Ácida Láctico (g/L)[a]	0,8	0,7	0,6	0,9	0,7
Açucares (g/L)[a]	1,4	2,6	3,8	0,6	1,9
Extracto Seco (g/L)[a]	20,3	25,5	29,9	22,6	26,3
Sulfuroso Total (mg/L)[b]	112	90	128	83	109
Sulfuroso Livre (mg/L)[b]	29	32	32	32	42
Índice de Polifenois totais[a]	30,8	29,6	39	37,8	39,4
Fenois totais[b]	42,9	45,7	53,8	42,5	42,6
Antocianas (mg/L)[b]	632	658	668	584	569
Intensidade cor[a]	14,1	12,6	14,8	18,3	14,8
Número de dias fim FML	47	40	80	59	38

[a] Análise por FTIR; [b] Análise Convencional

3.5. Análise microbiológica dos vinhos

Os vinhos foram mantidos em garrafões até a FML. Após a FML foram trasfegados e engarrafados em garrafas de vinho de 0,75 L. Durante este período realizaram-se as

análises microbiológicas, de forma a avaliar a evolução da carga microbiana dos diferentes vinhos produzidos. Na tabela 12 encontram-se os resultados das quantificações das leveduras totais e contagem de leveduras de alteração crescidas no meio de cultura específico e diferencial DBDM e ZDM presentes nas cinco modalidades, após a FML e 6 meses de estágio.

Pela observação da tabela 12 pode-se ver que a contagem de leveduras totais utilizando meio de cultura GYP, após a FML foi baixa, sendo a modalidade testemunha (T_0) a que apresenta uma maior contagem de leveduras totais, ao contrário do esperado.

Tabela 12 – Contagem de leveduras totais em meio GYP, leveduras de alteração crescidas em meio específico e diferencial DBDM específico para *Dekkera/Brettonomyces* e ZDM específico para *Zygosaccharomyces* presentes nas modalidades estudadas no fim da F.M.L e após 6 meses de estágio em garrafa.

Meio de cultura	Amostragem	100% Trincadeira			70% Cabernet Sauvignon + 30% Trincadeira	
		Testemunha	30% Podridão	50% Podridão	Testemunha	30% Podridão
		T_0	T_{30}	T_{50}	CT_0	CT_{30}
GYP	Após FML (UFC/mL)	$1,34\times10^5$	$7,8\times10^3$	$6,15\times10^3$	$8,5\times10^2$	$5,35\times10^3$
	Após 6 meses estágio (UFC/x mL)	384/100	<1/100	<1/100	31/100	190/100
DBDM	Após FML (UFC/x mL)	<1/50	26/1	25/50	182/1	25/10
	Após 6 meses estágio (UFC/100 mL)	<1	<1	<1	<1	<1
ZDM	Após FML (UFC/x mL)	198/50	<1/50	<1/50	<1/50	<1/50
	Após 6 meses estágio (UFC/100 mL)	<1	<1	<1	<1	<1

*Os resultados são médias de duas amostras

Depois de engarrafados e corrigidos com sulfuroso (40 mg/L de MK), os vinhos estagiaram em garrafa durante 6 meses, e foram sujeitos a nova análise microbiológica. Constatou-se uma contagem baixa de leveduras totais em qualquer das modalidades.

Na tabela 12 encontram-se os resultados da quantificação de leveduras de alteração crescidas em meio de cultura específico e diferencial DBDM. Pode-se observar que, após a FML, o crescimento de microrganismos em meio de cultura DBDM foi relativamente baixo em todas as modalidades. A modalidade CT_0 apresentou uma maior contagem de microrganismos, tendo-se confirmado a presença de *Dekkera bruxellensis* por análise de PCR-RFLP (ver ponto 3.5.1). Por sua vez, após o estágio de 6 meses em garrafa não ocorreu crescimento de microrganismos neste meio de cultura, explicável devido ao

tratamento executado depois da FML. Em relação ao meio ZDM, não ocorreu crescimento de leveduras em nenhuma das modalidades em estudo, excepto na modalidade $T_{0.}$

3.5.1. Espécies de leveduras isoladas nas diferentes modalidades

Depois dos isolados obtidos nos diferentes meios de cultura sólidos utilizados, os diferentes tipos morfológicos de colónias foram seleccionados e purificados através da realização de placas de isolamento contendo meio GYP sólido. A espécie de leveduras isoladas nos diferentes meios de cultura sólidos utilizados após a FML e 6 meses de estágio em garrafa, como se pode observar, a maioria das leveduras isoladas nas diferentes modalidades foi *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo IV). Verificou-se, o isolamento de *Dekkera bruxellensis* nas modalidades T_{50}, CT_0 e CT_{30} não havendo uma correlação entre a introdução de uvas podres com a contaminação desta levedura de alteração, o seu aparecimento pode ser explicado por uma contaminação proveniente da adega, nomeadamente da prensa de madeira utilizada. Também foi observado a contaminação de *Pichia sp*., na modalidade testemunha T_0 e *Trigonopsis sp.*na modalidade T_{50} e $CT_{30.}$ Depois do estágio de 6 meses apenas foi isolada *S. cerevisiae* de todas as modalidades, permitindo concluir que os vinhos estavam microbiologicamente estáveis (tabela 13).

Tabela 13 – Quantificação da flora de leveduras presentes nas 5 modalidades testadas após a F.M.L e 6 meses de estágio.

Fase	Modalidade	Espécie leveduras	Meios	Contagem (UFC/ x ml)
Após FML	T_0	*Saccharomyces cerevisiae*	**GYP**	$1{,}34\times10^5$ / 1
		Pichia sp.	**ZDM**	6 / 50
	T_{30}	*Saccharomyces cerevisiae*	**GYP**	$1{,}34\times10^3$ / 1
		Trigonopsis sp.	**DBDM**	26 / 10
	T_{50}	*Saccharomyces cerevisiae*	**GYP**	$6{,}15\times10^4$ / 1
		Dekkera bruxellensis	**DBDM**	11 / 50
		Trigonopsis sp.	**DBDM**	14 / 50
	CT_0	*Saccharomyces cerevisiae*	**GYP**	$7{,}0\times10^2$ / 1
		Dekkera bruxellensis	**DBDM**	$1{,}82\times10^2$ / 1
	CT_{30}	*Saccharomyces cerevisiae*	**GYP**	$5{,}35\times10^2$ / 1
		Dekkera bruxellensis	**DBDM**	2 / 10
		Trigonopsis sp.	**DBDM**	23 / 10
6 Meses de estágio	T_0	*Saccharomyces cerevisiae*	**GYP**	384 / 100
	CT_0	*Saccharomyces cerevisiae*	**GYP**	31 / 100
	CT_{30}	*Saccharomyces cerevisiae*	**GYP**	115 / 100

3.5.2. Quantificação de bactérias acéticas e lácticas

Para a avaliação da existência de bactérias acéticas e lácticas nas modalidades em estudo recorreu-se à técnica do Número Mais Provável (N.M.P), na tabela 14 encontram-se as contagens de microrganismos nas modalidades estudadas após a FML e 6 meses em estágio.

Os resultados obtidos, demonstraram que a contaminação em bactérias acéticas e lácticas foi relativamente baixa nas duas fases estudadas. No entanto, é de referir que foi observado um maior número de tubos positivos nas bactérias lácticas, resultado explicado devido ao facto de as análises terem sido executadas após a FML sendo possível ainda existir algumas bactérias lácticas no vinho. É de referir que a contaminação de bactérias acéticas foi baixa, em todas as modalidades, sendo a T_{50} a que apresenta menor contaminação, não se verificando uma relação com a introdução de uvas afectadas por podridão ácida. Após os 6 meses em estágio a contaminação dos vinhos por bactérias lácticas e acéticas foi mais baixo, resultado explicado devido ao tratamento com MK no engarrafamento. É de salientar que em alguns tubos positivos, foi necessário confirmar através de uma simples observação microscópica se houve crescimento bacteriano, ou se ocorreu contaminação por outros microrganismos.

Tabela 14 – Quantificação de bactérias lácticas e acéticas presentes nos vinhos analisados, após FML e estágio de 6 meses, utilizando a técnica do N.M.P.

Fase	Microrganismo	Modalidade	Contagem (NMP/mL)
Após FML	**Bactéria Láctica (Meio MRS)**	**T_0**	$4{,}5\times10^{1}$
		T_{30}	$1{,}1\times10^{3}$
		T_{50}	$1{,}4\times10^{4}$
		CT_0	$1{,}1\times10^{4}$
		CT_{30}	$1{,}4\times10^{4}$
	Bactéria Acéticas (Meio GY)	**T_0**	$2{,}5\times10^{1}$
		T_{30}	$2{,}5\times10^{1}$
		T_{50}	2,5
		CT_0	$2{,}5\times10^{1}$
		CT_{30}	2,5
Após 6 meses de estágio	**Bactéria Láctica (Meio MRS)**	**T_0**	2,5
		T_{30}	2,5
		T_{50}	2,5
		CT_0	$0{,}40\times10^{2}$
		CT_{30}	$1{,}10\times10^{3}$
	Bactéria Acéticas (Meio GY)	**T_0**	0
		T_{30}	$2{,}5\times10^{1}$
		T_{50}	0
		CT_0	0
		CT_{30}	0

3.6. Análise Sensorial dos Vinhos no fim da fermentação alcoólica

No final da fermentação alcoólica os vinhos em estudo foram sujeitos a uma análise sensorial recorrendo a um painel de 8 provadores. Na tabela 15 encontram-se as médias das notas atribuídas pelo painel aos atributos cor, aroma, gosto (escala de 0 a 5) e apreciação global (escala de 0 a 20) (Anexo II e III).

As notas melhores foram atribuídas aos vinhos produzidos de uvas sãs (T_0 e CT_{30}). No entanto, pela análise da variância os resultados demonstraram que através da análise sensorial não houve diferenças estatisticamente significativas, para qualquer atributo avaliado (Anexo V).

No entanto, é de mencionar que os vinhos produzidos com uvas podres apresentavam uma menor classificação relativamente, à intensidade de cor.

Tabela 15 – Avaliação organoléptica dos vinhos obtidos a partir de uvas sãs e com podridão ácida após fermentação alcoólica.

	Amostras – Vinhos											
	T_0		T_{30}		T_0		T_{50}		CT_0		CT_{30}	
COR												
INTENSIDADE	4,63	a	4,25	a	4,63	a	4,50	a	4,63	a	4,50	a
AROMA												
INTENSIDADE	3,38	a	3,38	a	3,38	a	3,38	a	3,75	a	3,75	a
QUALIDADE	3,38	a	3,38	a	3,38	a	2,88	a	3,13	a	3,13	a
EQUILÍBRIO	3,50	a	3,50	a	3,50	a	2,75	a	3,25	a	3,25	a
SOMAS PARCIAIS AROMA	**10,2**	a	**9**	a	**10,2**	a	**9**	a	**10,1**	a	**10,4**	a
GOSTO												
INTENSIDADE	3,63	a	3,63	a	3,63	a	3,75	a	3,50	a	3,50	a
QUALIDADE	2,63	a	2,63	a	2,63	a	2,13	a	3,13	a	3,13	a
CORPO	3,00	a	3,00	a	3,00	a	2,75	a	3,50	a	3,50	a
EQUILÍBRIO	2,75	a	2,75	a	2,75	a	2,00	a	2,63	a	2,63	a
PERSISTÊNCIA	3,25	a	3,25	a	3,25	a	2,75	a	3,25	a	3,25	a
FIM DE PROVA	3,00	a	3,00	a	3,00	a	2,75	a	3,38	a	3,38	a
SOMAS PARCIAIS GOSTO	**18,2**	a	**15,8**	a	**18,2**	a	**16,1**	a	**19,3**	a	**17,3**	a
APRECIAÇÃO GLOBAL	**14,19**	a	**13,38**	a	**14,19**	a	**13,38**	a	**15,00**	a	**14,25**	a

Valores médios na mesma linha, seguido de minúsculas diferentes de cor igual, representam diferenças significativas (P<0,05)

3.7. Análise Sensorial dos Vinhos após 6 meses em estágio de garrafa

Depois de engarrafados e corrigidos com sulfuroso, os vinhos permaneceram em estágio de garrafa (0,75 L) durante seis meses. Ao fim deste tempo, foram novamente sujeitos a uma análise sensorial recorrendo a um painel de 15 provadores Na tabela 16 encontram-se as médias das notas atribuídas pelo painel aos atributos cor, aroma, gosto (escala 0 a 5) e apreciação global (escala 0 a 20) (Anexo VI). Nesta mesma tabela encontram-se as somas parciais do aroma e do gosto.

Tabela 16 – Efeito da adição de uvas com podridão ácida nas características organolépticas dos vinhos produzidos seis meses de estágio em garrafa

	Amostras - Vinhos															
	T_0		T_{30}		T_0		T_{50}		T_{30}		T_{50}		CT_0		CT_{30}	
COR																
INTENSIDADE	3,56	a	3,50	a	3,56	a	3,40	b	3,50	a	3,40	a	3,80	a	3,33	b
AROMA																
INTENSIDADE	3,20	a	3,20	a	3,20	a	3,40	a	3,20	a	3,40	a	3,60	a	3,20	A
LIMPEZA	3,27	a	2,87	a	3,27	a	2,80	a	2,87	a	2,80	a	2,93	a	2,93	A
SOMAS PARCIAIS AROMA	**6,47**	a	**6,00**	a	**6,47**	a	**6,27**	a	**6,00**	a	**6,27**	a	**6,53**	a	**6,13**	A
GOSTO																
INTENSIDADE	3,07	a	3,07	a	3,07	a	2,87	a	3,07	a	2,87	a	3,20	a	3,20	A
LIMPEZA	3,07	a	3,27	a	3,07	a	2,67	a	3,27	a	2,67	b	2,87	a	3,13	A
EQUILÍBRIO	2,87	a	3,13	a	2,87	a	2,53	a	3,13	a	2,53	a	2,60	a	3,07	A
CORPO	2,93	a	2,87	a	2,93	a	2,60	a	2,87	a	2,60	a	2,93	a	3,00	A
PERSISTÊNCIA	2,73	a	3,07	a	2,73	a	2,87	a	3,07	a	2,87	a	3,00	a	3,33	A
FIM DE PROVA	3,00	a	2,80	a	3,00	a	2,53	a	2,80	a	2,53	a	3,14	a	3,00	A
SOMAS PARCIAIS GOSTO	**17,67**	a	**18,13**	a	**17,67**	a	**16,07**	a	**18,13**	a	**16,07**	a	**17,73**	a	**18,87**	A
APRECIAÇÃO GLOBAL	**13,60**	a	**13,67**	a	**13,60**	a	**12,80**	a	**13,67**	a	**12,80**	a	**13,40**	a	**13,60**	A

Valores médios na mesma linha, seguido de minúsculas diferentes de cor igual, representam diferenças significativas (P<0,05)

Os resultados demonstraram que através na avaliação sensorial ocorreram algumas diferenças ao nível do atributo cor entre a modalidade T_0 e T_{50} e entre a modalidade CT_0 e CT_{30} confirmando que estes dois vinhos são estatisticamente diferentes, para além disso é de referir um decréscimo das notas atribuídas a todos os vinhos após os 6 meses relativamente à análise sensorial anterior (tabela 15). Quando comparado com análise química representada na tabela 11 os vinhos produzidos com uvas afectadas com podridão ácida apresentam valores mais elevados de intensidade de cor relativamente as testemunhas, contrariando os resultados obtidos pela análise química. Constataram-se também, que ao nível do Gosto, na Limpeza do vinho os vinhos T_{30} e T_{50} são diferentes entre si. Quantos aos outros atributos podemos afirmar que não se verificaram diferenças estatísticas entre eles, apesar de ocorrer nesta prova relativamente a anterior representada no ponto 3.6 uma diminuição das notas atribuídas às modalidades produzidas somente com

uvas sãs T_{30} e T_{50}. Também foi possível observar que a modalidade T_{50} foi a menos classificada pelo painel quanto a apreciação global.

3.7.1. Características aromáticas dos vinhos

As cinco modalidades foram avaliadas ao nível aromático ao fim dos 6 meses de estágio em garrafas de 0,75 L, com o objectivo de definir um perfil sensorial associado aos vinhos que possuem na sua composição uvas afectadas com podridão ácida comparando com as modalidades testemunhas. Para esta análise foi pedido para cada provador associar um ou mais descritor aromático a cada um dos vinhos provados. Para este exercício foram utilizados alguns descritores como, o Floral, Frutado, Complexo, Incaracterístico, Maçã, Podre, Volátil, Cola, Químico e Outros que cada provador associava. Na Figura 10 encontram-se os gráficos referentes aos perfis aromáticos dos 5 vinhos avaliados, os quais refletem o número de vezes em que cada descritor aromático foi detectado pelos provadores (tabela 17).

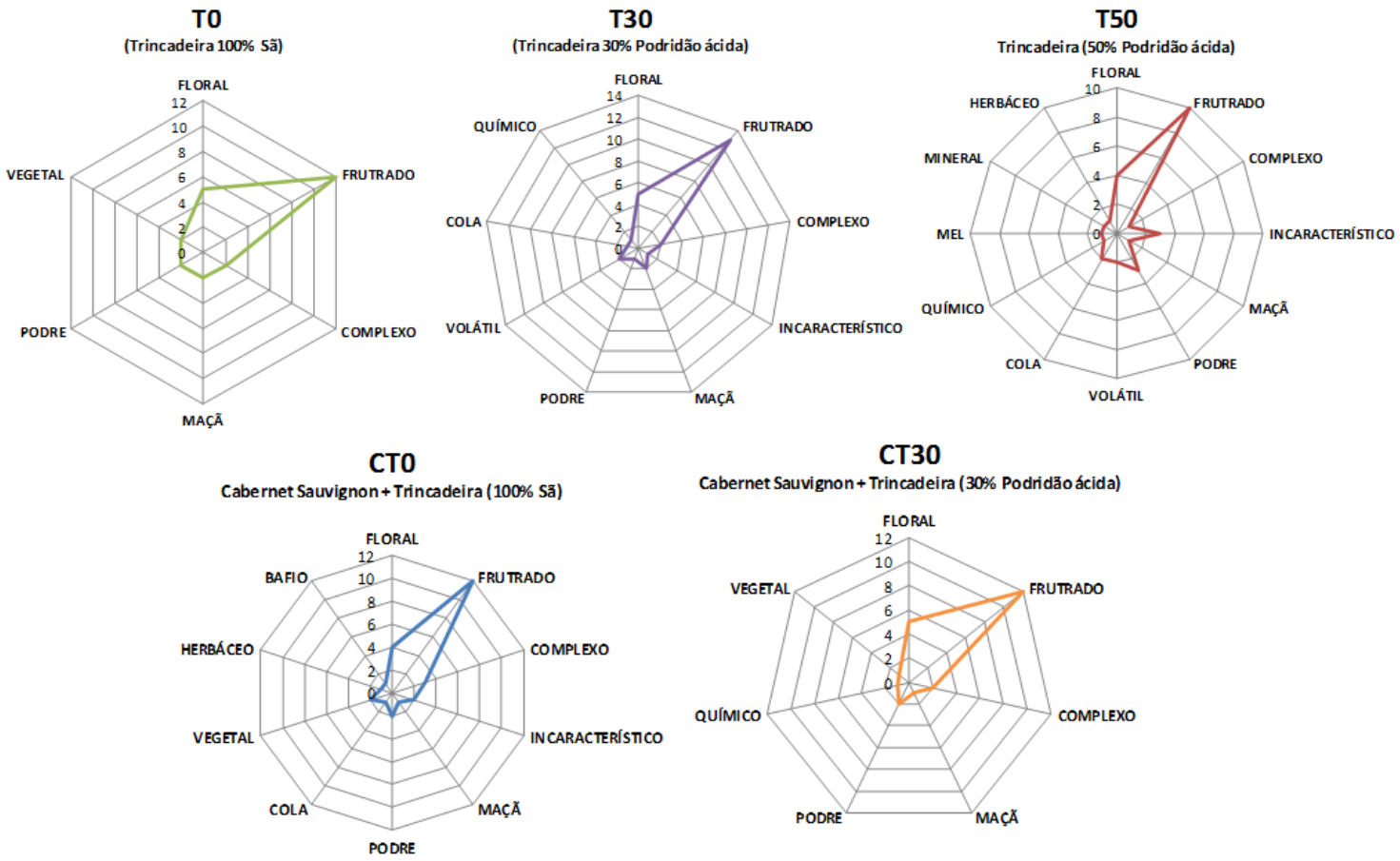

Figura 10 – Caracterização do perfil aromático dos 5 vinhos testados após 6 meses em garrafa com base nas frequências de detecção indicadas na tabela 17 para cada descritor.

Tabela 17 – Frequência de detecção dos descritores aromáticos indicados pelos 15 provadores (frequência máxima = 15), referentes aos 5 vinhos após 6 meses de estágio em garrafa.

	Vinhos				
Descritor aromático	**T0**	**T30**	**T50**	**CT0**	**CT30**
Floral	5	5	4	4	5
Frutado	12	13	10	12	12
Complexo	2	2	1	3	2
Incaracterístico		1	3	2	
Maçã	2	2	1	1	1
Podre	2	1	3	2	2
Volátil		2	2		
Cola		1	2	1	
Químico		1	1		1
Vegetal	2			2	1
Mel			1		
Mineral			1		
Herbáceo			1	1	
Bafio				1	

Através da análise da tabela 17, podemos verificar o que o perfil aromático associado a modalidade T_0 (testemunha), predomina o frutado e alguns provadores descreveram o aroma como sendo a podre. A modalidade T_{30}, constituída por 70% Trincadeira sã e 30% de Trincadeira podre, foi caracterizada pelo painel por apresentar um aroma essencialmente frutado e para alguns provadores identificaram o aroma a maçã, volátil e o complexo. No que diz respeito à modalidade $T_{50,}$ 50% de Trincadeira sã e 50% de Trincadeira podre, constata-se que neste vinho o painel identificou um maior número de descritores aromáticos, sendo mais uma vez o frutado predominante, seguindo-se o podre, incaracterístico, cola e mineral. Verificou-se que nesta modalidade ocorreu uma maior dificuldade do provador em identificar o aroma associado a uma maior percentagem da podridão nos vinhos.

Na modalidade CT_0, foi possível verificar uma concordância por parte dos provadores em identificarem o aroma frutado como o predominante neste vinho, ainda foi identificado o aroma a podre e a herbáceo por alguns provadores, por fim, a modalidade CT_{30}, o painel mencionou em maior proporção o aroma frutado e alguns provadores identificaram o atributo a podre e a vegetal mas em proporções bem menores.

É de mencionar que o painel não conseguiu identificar um aroma característico associado à podridão ácida. De facto, o aroma a podre foi atribuído tanto aos vinhos produzidos a partir de uvas sãs como aos vinhos produzidas com uvas podres.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho cumpriu os objectivos a que se propôs, tendo sido determinada a constituição química dos vinhos afectados por podridão ácida e avaliada a sua análise sensorial. Foi possível avaliar qual o real impacto da adição de uvas com podridão ácida na vinificação e nas característica organolépticas finais dos vinhos.

Os resultados obtidos durante a vindima de 2008 revelaram que os mostos, os vinhos e os vinhos após 6 meses de estágio em garrafa, referentes às modalidades com podridão ácida apresentaram um aumento nos valores dos parâmetros como a intensidade de cor, antocianas totais, fenóis totais e índice de polifenois totais directamente proporcional ao aumento da percentagem de podridão adicionada. Os resultados revelaram existir, igualmente, uma clara concentração do açúcar dos mostos e, por conseguinte, do grau alcoólico provável, à medida que a concentração de uvas com podridão aumentou. É de realçar também o aumento do extracto seco nas modalidades com uvas podres.

Foi possível constatar que, através da análise microbiológica executada após a FML, os vinhos se encontravam estáveis, tendo sido isoladas três estirpes de leveduras, *Pichia sp*. na modalidade T_0, *Trigonopsis sp*. da modalidade $T_{30,}$ T_{50} e CT_{30} e *Dekkera bruxellensis* na modalidade $T_{50,}$ CT_0 e CT_{30}. É de referir, também, que em todas as modalidades foi isolada *S. cerevisiae.* Após 6 meses de estágio em garrafa os vinhos encontravam-se microbiologicamente estáveis tendo sido apenas isolada *S. cerevisiae.* Quanto à quantificação de bactérias lácticas e acéticas esta foi baixa, contrariando os resultados referidos na bibliografia. É de mencionar o estudo da flora microbiana associada a esta doença, desenvolvida no laboratório de microbiologia do ISA durante os últimos 4 anos, demonstrou a maior inicidência de leveduras de alteração em uvas podres. No entanto, este trabalho demonstrou que é possível evitar a sua proliferação em vinhos estabilizados adequadamente.

Os resultados obtidos na primeira análise sensorial dos vinhos, demonstraram que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre os ensaios testemunha e os vinhos com podridão ácida.

Após os 6 meses de estágio os vinhos foram novamente sujeitos a uma análise sensorial, os resultados demonstraram diferenças ao nível do atributo cor entre a modalidade T_0 e T_{50} e entre a modalidade CT_0 e CT_{30} confirmando que estes dois vinhos são estatisticamente diferentes, também ao nível do atributo gosto, na limpeza os vinhos T_{30} e T_{50} são diferentes entre si, quanto aos outros atributos podemos afirmar que não se

verificaram diferenças estatísticas entre eles, apesar de ocorrer nesta prova relativamente a primeira análise sensorial uma diminuição das notas atribuídas às modalidades. Os vinhos foram sujeitos a uma avaliação aromática por parte do painel, constatando-se que o painel não conseguiu identificar um aroma característico associado à podridão ácida, sendo desejável desenvolver mais estudos futuros nesta temática.

É importante referir que foi possível vinificar uvas podres de forma que os vinhos finais sejam equivalentes, do ponto de vista organoléptico, aos vinhos produzidos com uvas sãs. De facto, se ensaios posteriores a nível da adega permitirem obter as mesmas conclusões, deve ser equacionado a actual desvalorização das uvas com podridão ácida e a forma como são vinificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abrunhosa, L., Paterson, R. R.M., Kozakiewicz, Z., Lima, N., e Venancio, A. (2001). Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* **32**: 240-242.

Aigrian, P. (1999). Conjouncture vitivinicole mondiale. *Bull. OIV*. **817-81**: 228-240.

Amaro, P. (2001). Sessão de encerramento. In Amaro, P. (Ed.). *Simp. Prática Prot. Prod. Integ. Vinha Portugal, Viana do Castelo,* Março **01** : 187-190.

Amaro, P. (2003). As medidas indirectas de luta contra as pragas e as infestantes da *vinha* e o uso sustentável dos pesticidas. In Amaro, P. (Ed.). *Coloq. A Protecção Integrada da Vinha, Évora, Outubro* **03**: 21-31.

Amaro, P., e Couto, C. (2004). Os inimigos da vinha e os pesticidas utilizados no seu combate em protecção integrada, In Amaro, P. (Ed.). *Manual Técnico de Protecção integrada da vinha na região Norte* pp. 12-26.

Amaro, P., e Freitas, J. (2004). Inimigos ocasionais, In Amaro, P. (Ed.). *Manual Técnico de Protecção integrada da vinha na região Norte* pp. 99-100.

Anónimo, (2009). http://www.vines.org

Barata, A., González, S., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A. e Loureiro, V. (2004). Efeito da utilização de uvas afectadas com podridão ácida na biodiversidade de leveduras em fermentação vinárias. *Actas do 6º Simpósio de Viticultura do Alentejo, Évora*, Portugal, Vol. 2, pp. 91-98.

Barata, A., Seborro, F., Belloch, C., Malfeito-Ferreira, M e Loureiro, V. (2008a). *Ascomycetous* yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *J Appl Microbiol* **104**: 1182-1191.

Barata, A., González, S., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A. e Loureiro, V. (2008b). Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Research* **8** (7): 1008-1017.

Barata, A., Santos, S., Malfeito-Ferreira, M e Loureiro, V. (2009). Fruit flies (*Drosophila* sp.) are essential to the development of sour rot in grapes. *2º International Symposium "Micro Safety Wine*"- 19, 20 Novembro, Martina França, Itália.

Battilani, P., Giorni, P., e Pietri, A. (2001). Role of cultural factors on the content of ochratoxin A in grape. *Journal of Plant Pathology* .**83**: 231.

Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P. e Kozakiewicz, Z., (2003). Occurence of ochratoxin A producing fungi in grape grow in Italy. *Journal of Food Protection*. **66**: 633- 636.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., e Lebrihi, A. (2006). Black aspergilli and ocratoxin A production in French vineyards. *International Journal of Food Microbiology*. **111**: S42-S52.

Benda, I. (2004). Zum einflush von hefen auf den glukonsaure- gehalt des weines. *Wein Wissenschaft* **39**:263-267, In: Zoecklein, B. W., F, K. C., Gump, B.H. e Nury, F. S. (Ed.). *Wine Analysis and Production*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York, United States of America. Chapter 3, pp53-75.

Bernard, J. L. e Bugaret, Y. (1989). La pourriture grise. Histoire d'une redecouverte. *Phytoma*, **412**: 26-30.

Bisiach, M., Minervini, G. e Salomone, M.C. (1982). Recherches expérimentales sur la pourriture acide de la grappe et sur rapports avec la pourriture grise. *Bull. OEPP* **12**: 5-28.

Bisiach, M., Minervini, G. e Zerbetto, F. (1986). Possible integrated of grapevine sour rot. *Vitis* **25:** 118-128.

Blancard, D., Gravot, E., Jailoux, F., e Fermaud, M. (2000). Etiologie de la pourriturre acide de la vigne dans le Sud-ouest de la France. *Integrated Control in Viticulture IOBC/wprs Bulletin*, **23** (4): 51-54.

Bleve, G., Grieco, F., Cozzi G., Logrieco, A., e Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeast with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*. **108**: 204-209.

Cabanes, F.J., Accens, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S., e Pons, A. (2001). Aspergillus carbonarius is a Source of Ochratoxin A. *Contamination in Wine Book of Abstracts "Bioactive Fungal Metabolites Impact and Exploitation*". Swansea, Wales. pp51.

Cabanes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castella, G., Minguez, S.e Pons, A., (2002). What is the source of Ocratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology* **79**: 213-215.

Charters, S. e Pettigrew, S. (2007). The dimensions of wine quality. *Food Quality and Preference* **18**: 997-1007.

Coutinho, C. (2002). Oídio, Traça e Podridão Cinzenta da Videira, In *DRAEDM. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pesca*s.

Costa, J., Amaro, P., e Freitas, J. (2004). Podridão cinzenta In Amaro, P. (Ed.). *Manual Técnico de Protecção integrada da vinha na região Norte* pp.52- 58.

Davenport, R.R., (1974). Microecology of yeasts and yeast like organisms associated with an English vineyard. *Vitis* **13**: 123-130.

Delpuech, J.M. (1993). La *Drosophile*, ou mouche du vinaigre. Lutte chimique, protection physique et autres possibilites de maîtrise. *Phytoma*. **454**: 45-47.

Dimakopoulou, M., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Pietri, A., Battilani, P., Avramidis, N., Markakis, E.A. e Tjamos, E.C. (2008). Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. *Biological Control* **46**: 158-165.

Donèche, B. (1992). Botrytized wines. In Fleet, G.H. (Ed.). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers. Singapore. Chapter 11, pp327- 349.

Doumergue, M. (2000). Le *Botrytis* surprend au dernier moment. Voyage a etapes au fil d'un CD Rom. *Phytoma*, **523** : 41-42.

Dubos, B. (1985). L'utilisation des Trichoderma comme agent de lutte biologique a l'egard de deux parasites aeriens : *Chondrostereum purpureum* (Pers. ex Fr.) pouzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* Pers. (pourriture grise de la vigne). L'emploi dénnemis naturels dans la protection des cultures, *Journée d'information INRA – SPV, Versailles*, 10 janvier **1985** : 35-49. (Cit. Santos, 2007).

Esteves-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., e Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J System Bact.* **49**: 329-337.

Fermaud, M. (1991). Donnes recentes sur le role de l'eudemis dans l'epidemiologie de la pourriture grise sur vigne. *Phytoma*, **431**: 39-42.

Fermaud M., Gravot, E., Blancard, D., Jailloux, F., e Stockel, J.(2000). Association of Drosophilae with microorganisms in Bordeaux vineyards affected by sour rot. IOBC/wprs Bulletin "*Integrated Control in Viticulture*" C. Lozzia Ed., Vol. **23** (4), 55-58.

Fermaud, M., Gravot, E., e Blancard, D. (2002). La Pourriture acide dans le vignoble bordelais. *Phytoma*. **547**: 41- 44.

Flanzy, C.(2000). *Enologia: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Madrid: Mundi Prensa.

Fleet, G.H. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol*. **50**: 101-117.

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*. **86**: 11-22.

Galet (1995). *Précis de pathologie viticole*. 2ª Ed.J.F.Impression., St. Jean de Védas. pp264.

Gomes, M.C.S.R. (2004). A podridão ácida das uvas: Trabalho preliminar para a caracterização da microflora associada, na região da Bairrada. Trabalho monográfico apresentado no âmbito do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto.

Gomes, (2006). http://www.drapc.min-agricultura.pt

Grassin, C., Dubourdieu, D., e Bernard, J. L. (1987). Prevision des consequences nefastes de la pourriture grise sur la qualite des vins : l'estimation des risques d'oxydation. *Phytoma*, **389** : 39-42.

Gravot, E., Blancard, D., Fermaud, M., Lonvaud, A., e Joyeux, A. (2001). La Pourriture acide. I. Étiologie: recherché de causes de cette pourriture dans le vignoble bordelaise. *Phytoma*. **543**:36-39.

Gravot, E. (2000). Interactions entre la Pourriture acide de la vigne et les populations de *drosophiles* dans la région bordelaise. Thèse de l´Université Paris.

Guerzoni, E. e Marchetti, R. (1986). Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers. *Applied Environmental Microbiology.* **53**: 571-576.

Hocking, A., Leong, S., Kazi, B., Emmett, R., e Scott, E. (2007). Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *Int. J. Food Microbiol*. **119**: 84-88. (Cit. Malfeito- Ferreira, *et al*., 2009).

Kazi, B.A., Emmet, R.W., Nancarrow, N., e Partington, D.L. (2007). Berry infection and the development if bunch rot in grapes caused by *Aspergillus carbonarius*. *Plant Pathology.*

Laurent, J.C. (1998). La pourriture acide. *Progrès Agricole et Viticole*. **115** (1): 7-9.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, B.A., Emmett, R.W., e Scott, E.S. (2006). Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *International Journal of Food Microbiology*. **111**: S10-S17.

Lisperguer, S., Piontelli, E. e Campos, V. (2003). Aislamiento y determinación de microorganismos presentes en la pudrición ácida de uvas de mesa, variedad Red Globe. XIII *Congreso Nacional de Fitopatología.*

Lopes, C. (2005). História evolução das vitáceas e da viticultura. Textos de apoio as aulas de viticultura geral, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Loureiro, V., e Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeast in the wine industry*. Int J Food Microbiol* **86**: 23-50.

Lorrain, R. e Romero, J.L. (1999). Au sujet de la pourriture acide. Sur l´incidence d´un nématode bactériophage: *Turbatrix aceti. Progrès Agricole et Viticole*. **116** (1): 6-7.

Malfeito-Ferreira. M., Barata,.A., e Loureiro, V. (2009). Wine Spoilage by Fungal Metabolites. In Moreno-Arribas, M.V.,e Polo, M.C. (Ed.). *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer. Madrid, Spain. Chapter 11, pp615- 639.

Marchetti, R., Guerzoni, M.E. e Gentile, M. (1984). Recherches sur l´étiologie d´une nouvelle maladie de la grappe: la pourriture acide. *Vitis* **23**: 55-65.

McCloskey, L.P. (1974). Gluconic acid in California wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. **Vol. 25**, n.4, pp 198-201.

Meroni, E., Torres, P., Vidal, G. e Vergnet, C. (1996). Effet secondaire de la bouillie bordelaise sur la pourriture acide des raisins. *Phytoma* **488**: 29-32.

Mortimer, R., e Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol*. **150**, 199-204.

Paff, H.J., Miller, M.W., Recca, J.A., Shifrine, M., e Mrake, E.M. (1956). Studies on the ecology of *Drosophila* in the Yosemite region of California. *Ecology*. **37**:533-538.

Paños, J.T. (1998a). La mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster* Meign.) In : *Los parasitos de la vid*. Estratégias de protecion razonada. 4ª Ed. Ministerio de Agricultura, Pescas y Alimentacion. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp.106-108.

Paños, J.T. (1998b). Podredume acide del racimo. In: *Los parasitos de la vid*. Estratégias de protecion razonada. 4ª Ed. Ministerio de Agricultura, Pescas y Alimentacion. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp. 230-232.

Peinado, R.A., Maestre, O., Mauricio, J. C., e Moreno, J.J. (2009). Use of a *Schizosaccharomyces pombe* mutant to reduce the content in gluconic acido f must obtained from rotten grapes. *J. Agric. Food Chem*. **57**: 2368-2377.

Pereira, A. M. N. (2003). As medidas indirectas de protecção e as doenças Parasitárias da videira. In Amaro, P.(Ed.). *Coloq. A Protecção Integrada da Vinha, Évora*, Outubro 0**3**: 13-21.

Perez, M. J. L. (1998). Podredumbre gris (*Botrytis cinerea* Pers.). In *MAPA . Los parasitos de la vid. Estrategias de protección razonada*. 183-188.

Perrone, G., Mulè, G., Battilani, P., Pietri, A., e Logrieco, A. (2006). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and A. *tubingensis* strains isolated from grapes in Italy. *Applied Environmental Microbiology*. **72:** 680-685.

Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., e Larroche, C. (2006). Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. *Food Technol. Biotechnol.* **44** (2): 185-195.

Ribéreau- Gayon P., e Stonestreet, E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans les vins rouges. *Bull. Soc. Chim.* **9**: 2649-2652.

Ribéreau- Gayon P., (1970). Le dosage des composé phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chim. Anal.*, **52**: 627-631.

Ribéreau-Gayon, P. (1988). *Botrytis*: Advantages and disadvantages for producing quality wines. In: Zoecklein, B. W., F, K. C., Gump, B.H. e Nury, F. S. (Ed.). *Wine Analysis and*

Production, Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York, United States of America. Chapter 3, pp53-75.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., e Lonvaund, A. (2006). *Handbook of Enology- The microbiology of wine and vinification*. (Ed.2), vol 2, Chapter 10, pp. 241-294.

Rodrigues, N., Gonçalves, G., Malfeito-Ferreira, M., e Loureiro, V. (2001). Development and use of a differencial médium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. J.Appl Microbiol. **90**:588-599.

Rosini, G., Federici, F., e Martini, A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbiol. Ecol*. **8**: 83-89.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., e Guillamón, J.M. (2002). Isolation and identification of yeast associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes. *Microbiol. Res*. **157**: 1-8.

Santos, M. F. C. dos. (2007). Influência do sistema de condução nos prejuízos resultantes da traça da uva e da podridão cinzenta nas castas Syrah e Trincadeira. Tese de Mestrado em Viticultura e Enologia, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

Schuller, D., Côrte-Real, M., e Leão, C. (2000). A differential médium for the enumeration of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in wine. *J Food Prot*. **63**: 1570-1575.

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., e Venâncio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology.* **88**: 63-68.

Shann, C. (1987a). Presenza di nematode in uve affette da marciume acido. L´*Informatore Agrario*. **43**: 137- 138.

Shann, C. (1987b). Correlazione trasistemi ecologicinel marciume acido delle uve. *Atti dell´Accademia Italiana della vite e del vino*. **39**: 333-355.

Silva, T. G. (1980). Controle de *Botrytis cinerea* em tomateiro de estufa. In SPFF. *I Congresso Português de Fitiatria e de Fitofarmacologia*, Lisboa, 15-19 Dezembro 1980: 201-208. (Cit. Santos, 2007).

Smith, M.TH., Shann, C., Vegte, W.H.B. van der, Schmitt, R., Werhrli, E., Roeijmans, H.J. e Eijk, G.W. van. (1992). *Botryozyma nematodophila* gen. nov., spec. nov. (*Candidaceae*). *Antonie van Leeuwenhoek* **61**: 277-284.

Sponholz, W.R., e Dittrich, H.H. (1985). Uber die Herkunf von Gluconsäure 2-und 5-oxo Gluconsäure sowie Glucuron- und Galacturonsäure in Mosten und Weinen. *Vitis* **24**: 51-58. In *Wine Microbiology- Pratical Applications and Procedures*. Fugelsang, K e Edwards, C.G. (Ed.), Chapter 3, pp. 45-49. Springer.

Sponholz, W.R. (1992). Wine spoilage by microorganisms. In Fleet, G.H.(Ed.). *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers. Singapore. pp. 395-420.

Spring, J.L., e Viret, O. (2009). Influences des techniques d´éclaircissage sur le rendement, la morphologie des grappes, la pourriture et la qualité des vins de Pinot noir. *Revue suìsse Vitic. Arboric.Hortic.* vol **41** (2): 95-101.

Taras, M. J. (1971). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: *American Public Health Association*, 874 p.

Thomas, D.S., Hossack, J. A. e Rose, A. H. (1978). Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae. Arch.Microbiol*., **117**: 239-245.

Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., e Tjamos, E.C. (2006). *Aspergillus* spp. distribution, population composition and ochratoxin A production in wine-producing vineyards in Greece. *International Journal Microbiology*. **111**: S61-S66.

Tomaz, I. L., e Costa, M. E. A. P. (1983). Identificação dos fungos patogénicos das plantas. *Lab. Patologia Vegetal Verissimo de Almeida, AEA*, Lisboa, pp59.

Torres, P. (1998). Cuivre et pourriture acide. *Progrès Agricole et Viticole*. **115** (1): 10-13.

Van der Westhuizen, T., Augustyn, O., Khan, W., e Pretorius, I.S. (2000a). Geographical distribution of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyard in the coastel regional of the Western Cape in south Africa. *South Afr. J. Enol. Vitic*. **21**: 3-9.

Van der Westhuizen, T., Augustyn, O., Khan, W., e Pretorius, I.S. (2000b). Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyard of the Western Cape in south Africa. *South Afr. J. Enol. Vitic*. **21**: 10-15.

Zoecklein, B. W., Williams, J.M. e Duncan, S.E. (2000a). Effect of grape sour rot on the composition White Riesling (*Vitis vinifera L*.) grapes. *J. Small Fruits Review*. **1**: 63-77.

Zoecklein, B. W., F, K. C., Gump, B.H. e Nury, F. S. (2000b). *Wine Analysis and Production*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York, United States of America. Chapter 3, pp53-75.

Anexo I

Técnica Número Mais Provável (N.M.P.)

1. Regras necessárias para escolher as 3 diluições definidoras do Número Característico:

   - Se apenas uma diluição apresenta **todos** os tubos positivos, escolha o conjunto de 3 diluições consecutivas mais diluídas que a inclua;

   - Se mais do que uma diluição apresenta **todos** os tubos positivos, escolha o conjunto que inclua, delas, apenas a mais diluída;

   - Se apenas uma apresenta diluição **nenhum** tubo positivo, escolha o conjunto dos mais concentrados que a inclua;

   - Se mais do que uma diluição apresenta **nenhum** tubo positivo, escolha o conjunto que inclua delas, a mais concentrada;

   - Se a aplicação das 4 regras anteriores seleccionar o mesmo conjunto de 3 diluições, a entrada na tabela fornece directamente o N.M.P..

   - Se a aplicação dessas mesmas regras seleccionar 4 diluições diferentes, tome os 2 conjuntos de 3 diluições que pode com elas formar, obtenha da tabela os respectivos N.M.P., converta-os em logaritmos de base 10. Ao número assim determinado deverá ser dado o significado de indicação grosseira de população microbiana;

   - Se aplicação das 4 regras seleccionar mais do que 4 diluições diferentes, então estas tabelas não poderão ser aplicadas aos dados. Poderá recorrer-se á tabela de W.L. Steves, apresentada sob o número VIII, 2 por Fisher e Yates (1963) para estimar a densidade de organismos e significância correspondente. Nesse caso, porém aconselha-se que se repita o ensaio, sempre que possível, visando corrigir possíveis deficiências técnicas.

2. Tabela dos valores de N.M.P. para 3 repetições de diluições sucessivas de razão 1:10.

Númer de resultados positivos [1]			NMP[2]	Número de resultados positivos[1]			NMP[2]
a	**b**	**c**		**a**	**b**	**c**	
0	0	0	<0,3	2	2	0	2,1
0	0	1	0,3	2	2	1	2,8
0	1	0	0,3	2	2	2	3,5
0	1	1	0,6	2	3	0	2,9
0	2	0	0,6	2	3	1	3,6
0	3	0	0,9	3	0	0	2,3
1	0	0	0,4	3	0	1	3,8
1	0	1	0,7	3	0	2	6,4
1	0	2	1,1	3	1	0	4,3
1	1	0	0,7	3	1	1	7,5
1	1	1	1,1	3	1	2	12,0
1	2	0	1,1	3	1	3	16,0
1	2	1	1,5	3	2	0	9,3
1	3	0	1,5	3	2	1	15,0
2	0	0	0,9	3	2	2	21,0
2	0	1	1,4	3	2	3	29,0
2	0	2	2,0	3	3	0	24,0
2	1	0	1,5	3	3	1	46,0
2	1	1	2,0	3	3	2	110,0
2	1	2	2,7	3	3	3	>110,0

1- Número de tubos positivos observados nas diluições a,b e c

2- Número Mais Provável de microrganismos por ml. Para referir à amostra inicial multiplicar pelo expoente de 10 correspondente à diluição a.

Taras, M.J., (1971), Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: American Public Health Association, 874 p.

Anexo II

Ficha de Prova – Vinhos Tintos

Nome :

Data: / / 2008

Prove os vinhos na ordem apresentada e classifique os diferentes atríbutos, utilizando as seguintes escalas de 1 a 5, sendo:

Cor

1- Inexistente
2- Pouco Intensa
3- Intensa
4- Bastante Intensa
5- Muito Intensa

Aroma / Gosto / Apreciação Global

1- Medíocre
2- Satisfatório
3- Bom
4- Muito Bom
5- Excelente

		Vinhos/ Códigos			
Cor	Intensidade				
Aroma	Intensidade				
	Qualidade				
	Equilíbrio				
Gosto	Intensidade				
	Qualidade				
	Corpo				
	Equilíbrio				
	Persistência				
	Fim de Prova				
Fim de Prova					

Observações:

Anexo III

Ficha de prova – Vinhos Tintos

Nome:	**Data:** / /2009

A. Prove os vinhos na ordem apresentada e classifique os diferentes atributos, utilizando as seguintes escalas:

Cor: 1- Inexistente; **2**- Pouco Intensa; **3**- Intensa; **4**- Bastante Intensa; **5**- Muito Intensa

Aroma/Gosto: 1- Medíocre; **2**- Satisfatório; **3**- Bom; **4**- Muito Bom; **5**- Excelente

Apreciação Global: utilize uma escala hedónica de **0** a **20**.

		Vinhos/ Códigos				
Cor	Intensidade					
Aroma	Intensidade					
	Limpeza					
Gosto	Intensidade					
	Limpeza					
	Equilíbrio					
	Corpo					
	Persistência					
	Fim de Prova					
Apreciação Global						

B. Ao nível do aroma assinale, com uma cruz, qual ou quais das seguintes características associa a cada vinho provado.

Características Gerais	**Vinhos/Códigos**				
Floral					
Frutado					
Complexo					
Incaracterístico					
Maçã					
Podre					
Volátil					
Cola					
Químico					
Outros					

Observações:

Anexo IV

Tabela 1 – Leveduras isoladas a partir dos meios de cultura sólidos utilizados após a FML e estágio de 6 meses em garrafa.

Fase	Modalidade	Isolado	Meio de Cultura	Contagem (UFC/mL	Espécie
Após F.M.L	T_0	LML08_1	GYP	$4,5\times10^3$	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_2	GYP	3×10^3	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_3	ZDM	2/50	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_4	ZDM	4/50	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_5	ZDM	20/50	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_6	ZDM	6/50	***Pichia sp.***
		LML08_7	ZDM	156/50	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_8	ZDM	10/50	*Saccharomyces cerevisiae*
	T_{30}	LML08_9	GYP	$7,5\times10^3$ UFC/mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_10	GYP	$2,5\times10^2$ UFC/mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_11	GYP	5,0×10 UFC/mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_12	DBDM	26/10 mL	***Trigonopsis sp.***
		LML08_13	DBDM	3/1 mL	*Saccharomyces cerevisiae*
	T_{50}	LML08_26	GYP	$2,5\times10^2$ UFC/mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_27	ZDM	$1,66\times10^3$ UFC/mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_28	ZDM	100/50 mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_29	DBDM	11/50 mL	***Dekkera bruxellensis***
		LML08_30	DBDM	14/50 mL	*Trigonopsis sp.*
	CT_0	LML08_ 14	GYP	7,0×10 UFC/mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_ 15	GYP	$1,5\times10^2$ UFC/mL	***Dekkera bruxellensis***
		LML08_ 16	ZDM	$3,19\times10^3$ UFC/mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_ 17	ZDM	$5,52\times10^2$ UFC/mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_ 18	DBDM	$1,76\times10^2$ UFC/mL	***Dekkera bruxellensis***
		LML08_ 19	DBDM	6/1 mL	***Dekkera bruxellensis***
	CT_{30}	LML08_20	GYP	1,5×10 UFC/mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_21	DBDM	23/10 mL	***Trigonopsis sp.***
		LML08_22	DBDM	2/10 mL	***Dekkera bruxellensis***
		LML08_23	ZDM	$5,28\times10^3$ UFC/mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_24	ZDM	12/1 mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		LML08_25	ZDM	10/1 mL	*Saccharomyces cerevisiae*
Após 6 meses de estágio	**T_0**	L6M01	GYP	384/100 mL	*Saccharomyces cerevisiae*
	T_{30}	L6M02	GYP	19/10 mL	*Saccharomyces cerevisiae*
	T_{50}	L6M03	GYP	115/100 mL	*Saccharomyces cerevisiae*
	CT_0	L6M04	GYP	4/100 mL	*Saccharomyces cerevisiae*
	CT_{30}	L6M05	GYP	4/100 mL	*Saccharomyces cerevisiae*
		L6M06	DBDM	2/100 mL	*Saccharomyces cerevisiae*

Anexo V

Tabela 1: Resultados obtidos na primeira Análise Sensorial.

	Atributo COR Vinhos				
Provador	**T0**	**T30**	**T50**	**CT0**	**CT30**
1	5	4	4	5	5
2	4	4	4	4	4
3	4	4	4	4	4
4	5	4	5	5	5
5	5	4	5	5	4
6	5	5	5	5	5
7	5	5	5	5	5
8	4	4	4	4	4
média	**4,625**	**4,25**	**4,5**	**4,625**	**4,5**

	Somas parciais atributos AROMA Vinhos				
Provador	**T0**	**T30**	**T50**	**CT0**	**CT30**
1	12	10	10	10	12
2	11	10	9	10	12
3	12	9	7	11	14
4	11	9	10	12	9
5	8	5	9	8	8
6	12	12	12	12	12
7	7	9	9	9	8
8	9	8	6	9	8
media	**10,25**	**9**	**9**	**10,125**	**10,375**

	Somas parciais atributos GOSTO Vinhos				
Provador	**T0**	**T30**	**T50**	**CT0**	**CT30**
1	26	18	20	27	26
2	12	12	10	12	12
3	19	16	14	22	17
4	21	13	16	22	18
5	19	18	20	17	16
6	20	20	20	20	18
7	16	17	18	20	18
8	13	13	11	15	14
media	**18,25**	**15,875**	**16,125**	**19,375**	**17,375**

	APRECIAÇÃO GLOBAL				
	Vinhos				
Provador	**T0**	**T30**	**T50**	**CT0**	**CT30**
1	17	13	14	17	18
2	12	12	11	12	12
3	15	14	12	18	16
4	14,5	13	14	16	15
5	14	14	15	13	13
6	16	16	16	16	15
7	13	14	15	15	13
8	12	11	10	13	12
media	**14,19**	**13,38**	**13,38**	**15,00**	**14,25**

Tabela 2: Análise estatítica da primeira análise sensorial

One-Way ANOVA on columns selected between Col(A) -> Col(I)

Data	Mean	Variance	N
A	12.125	2.69643	8
B	12.375	1.69643	8
C	13	2.85714	8
D	10.75	2.21429	8
E	14.1875	3.28125	8
F	13.375	2.26786	8
G	13.375	4.55357	8
H	15	4.57143	8
I	14.25	4.5	8

F = 4.16181
p = 4.85552E-4

At the 0.05 level,
the means are significantly different.

[23-10-2008 11:46 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(A) -> Col(I):

Data	Mean	Variance	N
A	12.125	2.69643	8
B	12.375	1.69643	8
C	13	2.85714	8
D	10.75	2.21429	8
E	14.1875	3.28125	8
F	13.375	2.26786	8
G	13.375	4.55357	8
H	15	4.57143	8
I	14.25	4.5	8

F = 4.16181
p = 4.85552E-4

At the 0.05 level,
the means are significantly different.

[23-10-2008 11:47 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(A) -> Col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	12.125	2.69643	8
B	12.375	1.69643	8

F = 0.11382
p = 0.74084

At the 0.05 level,
the means are NOT significantly different.

[23-10-2008 11:47 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(B) -> Col(C):

Data	Mean	Variance	N
B	12.375	1.69643	8
C	13	2.85714	8

F = 0.68627
p = 0.42133

At the 0.05 level,
the means are NOT significantly different.

[23-10-2008 11:47 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(C) -> Col(D):

Data	Mean	Variance	N
C	13	2.85714	8
D	10.75	2.21429	8

F = 7.98592
p = 0.01347

At the 0.05 level,
the means are significantly different.

[23-10-2008 11:48 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(D) -> Col(E):

Data	Mean	Variance	N
D	10.75	2.21429	8
E	14.1875	3.28125	8

F = 17.20146
p = 9.86429E-4

At the 0.05 level,

the means are significantly different.

[23-10-2008 11:48 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(E) -> Col(F):

Data	Mean	Variance	N
E	14.1875	3.28125	8
F	13.375	2.26786	8

F = 0.95173
p = 0.34584

At the 0.05 level,
the means are NOT significantly different.

[23-10-2008 11:48 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(F) -> Col(G):

Data	Mean	Variance	N
F	13.375	2.26786	8
G	13.375	4.55357	8

F = 0
p = 1

At the 0.05 level,
the means are NOT significantly different.

[23-10-2008 11:49 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(G) -> Col(H):

Data	Mean	Variance	N
G	13.375	4.55357	8
H	15	4.57143	8

F = 2.31507
p = 0.15039

At the 0.05 level,
the means are NOT significantly different.

[23-10-2008 11:49 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(H) -> Col(I):

Data	Mean	Variance	N
H	15	4.57143	8
I	14.25	4.5	8

F = 0.49606
p = 0.49279

At the 0.05 level,
the means are NOT significantly different.

[23-10-2008 11:50 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(A) -> Col(D):

Data	Mean	Variance	N
A	12.125	2.69643	8
B	12.375	1.69643	8
C	13	2.85714	8
D	10.75	2.21429	8

F = 3.04654
p = 0.04508

At the 0.05 level,
the means are significantly different.

[23-10-2008 11:50 "/Data1" (2454762)]
One-Way ANOVA on columns selected between Col(A) -> Col(C):

Data	Mean	Variance	N
A	12.125	2.69643	8
B	12.375	1.69643	8
C	13	2.85714	8

F = 0.67241
p = 0.52113

At the 0.05 level,
the means are NOT significantly different.

ResultsLog
”
[23-10-2008 11:25 "/Data1" (2454762)]
One population t-Test on Data1 col(B):

Data	Mean	Variance	N
B	13	2.85714	8

t = 21.75316
p = 1.09465E-7

At the 0.05 level,
the two means are significantly different.

[23-10-2008 11:26 "/Data1" (2454762)]
Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	12.125	2.69643	8
B	13	2.85714	8

t = 1.05019
p = 0.31142

At the 0.05 level,
the two means are NOT significantly different.

[23-10-2008 11:29 "/Data3" (2454762)]
Independent t-Test on Data3 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	12.375	1.69643	8
B	10.75	2.21429	8

t = -2.32418
p = 0.03567

At the 0.05 level,
the two means are significantly different.

[23-10-2008 11:33 "/Data6" (2454762)]
Independent t-Test on Data6 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	14.1875	3.28125	8
B	13.375	2.26786	8

t = -0.97557
p = 0.34584

At the 0.05 level,
the two means are NOT significantly different.

[23-10-2008 11:35 "/Data9" (2454762)]
Independent t-Test on Data9 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	14.1875	3.28125	8
B	13.375	4.55357	8

t = -0.82102
p = 0.4254

At the 0.05 level,
the two means are NOT significantly different.

[23-10-2008 11:38 "/Data12" (2454762)]
Independent t-Test on Data12 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	15	4.57143	8
B	14.25	4.5	8

t = -0.70432
p = 0.49279

At the 0.05 level,
the two means are NOT significantly different.

AnexoVI

Tabela 1: Médias, desvio padrão e variância do atributo Cor

	COR				
PROVADOR	**T0**	**T30**	**T50**	**CT0**	**CT30**
1	3	4	4	5	3
2	3	3	3	4	3
3	4	4	3	4	4
4	4	3	3	3	2
5	4	3	3	4	3
6	4	5	4	4	4
7	4	4	3	3	3
8	4	4	4	4	4
9	3	3	3	4	4
10	3	3	3	4	4
11	5	4	3	3	3
12	4	4	3	4	3
13	4	4	4	4	3
14	4	4	4	4	3
15	4	4	4	3	3
Media	**3,80**	**3,73**	**3,40**	**3,80**	**3,27**
desvio padrão	0,54	0,57	0,49	0,54	0,57
Variância	0,31	0,35	0,26	0,31	0,35

Tabela 2: Médias, desvio padrão e variância do atributo Aroma

	Somas parciais do AROMA				
PROVADOR	**T0**	**T30**	**T50**	**CT0**	**CT30**
1	9	5	8	5	3
2	7	5	5	7	6
3	8	6	8	6	6
4	6	6	7	6	4
5	5	7	4	7	6
6	8	9	7	8	10
7	4	6	7	7	7
8	6	6	5	6	7
9	7	7	7	8	8
10	7	6	6	7	8
11	7	6	6	5	6
12	5	6	7	6	4
13	7	4	6	7	5
14	5	6	8	7	6
15	6	5	3	6	6
Media	6,47	6,00	6,27	6,53	6,13
desvio padrão	1,31	1,10	1,44	0,88	1,71
Variância	1,84	1,29	2,21	0,84	3,12

Tabela 3: Médias do atributo AROMA- Intensidade

	AROMA-Intensidade				
PROVADORES	1	2	3	4	5
1	4	3	4	2	2
2	3	3	3	4	3
3	4	4	3	4	4
4	4	3	3	3	2
5	4	3	3	4	3
6	4	4	5	4	5
7	2	3	3	4	4
8	3	4	4	3	4
9	3	4	4	4	4
10	3	3	3	4	4
11	4	3	3	3	3
12	4	4	4	4	2
13	3	2	3	4	3
14	2	3	4	4	3
15	3	2	2	3	3
médias	**3,33**	**3,20**	**3,40**	**3,60**	**3,27**

Tabela 4: Médias do atributo AROMA- Limpeza

	AROMA- Limpeza				
PROVADORES	1	2	3	4	5
1	5	2	4	3	1
2	4	3	2	3	3
3	4	3	4	2	3
4	3	3	3	3	2
5	2	3	2	3	3
6	4	4	3	4	5
7	2	3	4	3	3
8	3	2	1	3	3
9	4	3	3	4	4
10	4	3	3	3	4
11	3	3	3	2	3
12	1	3	2	2	2
13	4	2	3	3	2
14	3	3	4	3	3
15	3	3	1	3	3
médias	**3,27**	**2,87**	**2,80**	**2,93**	**2,93**

Tabela 5: Somas Parciais do Gosto

	Somas parciais do GOSTO				
PROVADOR	**T0**	**T30**	**T50**	**CT0**	**CT30**
1	22	19	15	19	21
2	20	19	17	23	19
3	17	23	19	25	19
4	16	14	17	16	18
5	13	16	11	16	14
6	20	23	19	20	23
7	13	13	18	10	13
8	14	20	15	14	20
9	20	25	17	23	26
10	19	17	15	20	19
11	20	19	17	15	23
12	17	14	15	15	16
13	21	19	17	15	18
14	17	17	20	20	17
15	16	14	9	15	17
Media	**17,67**	**18,13**	**16,07**	**17,73**	**18,87**
desvio padrão	2,80	3,52	2,84	3,96	3,32
Variância	8,38	13,27	8,64	16,78	11,84

Tabela 6 : Média do Atributo Gosto-Intensidade

	GOSTO-Intensidade				
PROVADORES	1	2	3	4	5
1	4	3	4	4	4
2	3	3	3	3	3
3	3	4	3	4	3
4	2	2	3	3	2
5	2	2	2	2	2
6	3	4	3	3	4
7	2	3	3	1	2
8	3	3	3	4	4
9	4	4	3	4	4
10	3	3	3	4	4
11	4	3	3	3	4
12	3	3	3	3	3
13	4	3	3	4	3
14	3	3	3	3	3
15	3	3	1	3	3
médias	**3,07**	**3,07**	**2,87**	**3,20**	**3,20**

Tabela 7 : Média do Atributo Gosto-Limpeza

	GOSTO- Limpeza				
PROVADORES	1	2	3	4	5
1	4	4	1	1	4
2	3	3	2	3	3
3	4	4	4	4	3
4	3	3	3	3	3
5	2	2	2	3	3
6	3	3	3	3	3
7	3	3	3	2	2
8	2	4	2	2	3
9	3	4	3	4	4
10	4	3	2	3	3
11	3	3	3	3	4
12	3	2	3	2	3
13	3	4	3	3	2
14	4	4	4	4	4
15	2	3	2	3	3
médias	**3,07**	**3,27**	**2,67**	**2,87**	**3,13**

Tabela 8 : Média do Atributo Gosto-Equilíbrio

	GOSTO- Equilíbrio				
PROVADORES	1	2	3	4	5
1	4	4	3	3	3
2	3	3	3	3	3
3	3	4	4	4	3
4	3	2	2	3	2
5	3	3	2	3	3
6	3	4	3	3	4
7	2	2	3	1	2
8	2	3	2	1	3
9	3	5	3	4	5
10	2	2	2	3	3
11	4	4	3	2	4
12	2	2	1	2	2
13	3	4	3	2	3
14	3	3	3	3	3
15	3	2	1	2	3
médias	**2,87**	**3,13**	**2,53**	**2,60**	**3,07**

Tabela 9: Média do Atributo Gosto-Corpo

	GOSTO -Corpo				
PROVADORES	1	2	3	4	5
1	4	2	2	4	3
2	4	3	3	4	3
3	2	4	2	4	3
4	3	2	4	4	4
5	2	3	2	3	2
6	4	4	3	3	4
7	2	2	3	1	2
8	2	4	2	2	3
9	3	4	2	4	4
10	3	3	3	3	3
11	2	2	2	2	3
12	3	2	2	3	3
13	4	3	3	1	2
14	3	3	4	4	3
15	3	2	2	2	3
médias	**2,93**	**2,87**	**2,60**	**2,93**	**3,00**

Tabela 10: Média do Atributo Gosto- Persistência

	GOSTO - PERSISTENCIA				
PROVADORES	1	2	3	4	5
1	3	4	3	3	4
2	3	4	3	4	4
3	2	4	3	5	4
4	2	2	3	2	3
5	2	3	1	2	2
6	3	4	4	4	4
7	2	2	3	3	3
8	3	3	3	3	4
9	4	4	3	3	5
10	3	3	3	3	3
11	3	3	3	3	4
12	3	3	3	2	2
13	4	3	3	3	4
14	2	2	3	3	2
15	2	2	2	2	2
médias	**2,73**	**3,07**	**2,87**	**3,00**	**3,33**

Tabela 11: Média do Atributo Gosto-Fim de Prova

	GOSTO - Fim d Prova				
PROVADORES	1	2	3	4	5
1	3	2	2	4	3
2	4	3	3	3	3
3	3	3	3	4	3
4	3	3	2	3	2
5	2	3	2	3	2
6	4	4	3	4	4
7	2	1	3	2	2
8	2	3	3	2	3
9	3	4	3	4	4
10	4	3	2	4	3
11	4	4	3	2	4
12	3	3	3	3	3
13	3	2	2	2	4
14	2	2	3	3	2
15	3	2	1	3	3
médias	**3,00**	**2,80**	**2,53**	**3,07**	**3,00**

Tabela 12: Somas parciais da Atribuição Global

	APRECIAÇÃO GLOBAL				
PROVADOR	**T0**	**T30**	**T50**	**CT0**	**CT30**
1	15	13	11	10	14
2	15	14	13	16	14
3	11	13	14	15	12
4	15	14	16	15	12
5	12	14	11	14	12
6	15	16	14	15	17
7	10	12	15	11	10
8	12	15	10	12	13
9	12	14	11	13	15
10	15	13	12	15	14
11	15	14	12	12	14
12	12	14	13	13	14
13	17	14	15	12	16
14	14	13	15	15	13
15	14	12	10	13	14
media	**13,60**	**13,67**	**12,80**	**13,40**	**13,60**
desvio padrão	1,89	1,01	1,90	1,70	1,67
variancia	3,83	1,10	3,89	3,11	2,97

Tabela 13: Análise estatística realizada na segunda sessão de análise sensorial (Teste t-Student, p<0,05).

	PARAMETRO	AMOSTRAS	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1	Std.Dev. Group 2	F-ratio Variances	p Variances
COR		T0 vs T30	3,8000	3,7333	0,3162	28	0,7542	15	15	0,5606	0,5936	1,1212	0,8335
		T0 vs T50	**3,8000**	**3,4000**	**2,0494**	**28**	**0,0499**	**15**	**15**	**0,5606**	**0,5071**	**1,2222**	**0,7125**
		T30 vs T50	3,7333	3,4000	1,6536	28	0,1094	15	15	0,5936	0,5071	1,3704	0,5634
		CT0 vs CT30	**3,8000**	**3,2667**	**2,5298**	**28**	**0,0173**	**15**	**15**	**0,5606**	**0,5936**	**1,1212**	**0,8335**
AROMA	**INTENSIDADE**	T0 vs T30	3,3333	3,2000	0,5214	28	0,6062	15	15	0,7237	0,6761	1,1458	0,8025
		T0 vs T50	3,3333	3,4000	-0,2500	28	0,8044	15	15	0,7237	0,7368	1,0364	0,9477
		T30 vs T50	3,2000	3,4000	-0,7746	28	0,4451	15	15	0,6761	0,7368	1,1875	0,7523
		CT0 vs CT30	3,6000	3,2667	1,1880	28	0,2448	15	15	0,6325	0,8837	1,9524	0,2230
	LIMPEZA	T0 vs T30	3,2667	2,8667	1,3416	28	0,1905	15	15	1,0328	0,5164	4,0000	0,0140
		T0 vs T50	3,2667	2,8000	1,2486	28	0,2221	15	15	1,0328	1,0142	1,0370	0,9467
		T30 vs T50	2,8667	2,8000	0,2269	28	0,8222	15	15	0,5164	1,0142	3,8571	0,0165
		CT0 vs CT30	2,9333	2,9333	0,0000	28	1,0000	15	15	0,5936	0,9612	2,6216	0,0820
	SOMAS PARCIAIS	T0 vs T30	6,4667	6,0000	1,0226	28	0,3152	15	15	1,3558	1,1339	1,4296	0,5124
		T0 vs T50	6,4667	6,2667	0,3850	28	0,7031	15	15	1,3558	1,4864	1,2021	0,7354
		T30 vs T50	6,0000	6,2667	-0,5524	28	0,5850	15	15	1,1339	1,4864	1,7185	0,3226
		CT0 vs CT30	6,5333	6,1333	0,7783	28	0,4429	15	15	0,9155	1,7674	3,7273	0,0193
GOSTO	**INTENSIDADE**	T0 vs T30	3,0667	3,0667	0,0000	28	1,0000	15	15	0,7037	0,5936	1,4054	0,5327
		T0 vs T50	3,0667	2,8667	0,8143	28	0,4223	15	15	0,7037	0,6399	1,2093	0,7271
		T30 vs T50	3,0667	2,8667	0,8874	28	0,3824	15	15	0,5936	0,6399	1,1622	0,7825
		CT0 vs CT30	3,2000	3,2000	0,0000	28	1,0000	15	15	0,8619	0,7746	1,2381	0,6950
	LIMPEZA	T0 vs T30	3,0667	3,2667	-0,7783	28	0,4429	15	15	0,7037	0,7037	1,0000	1,0000
		T0 vs T50	3,0667	2,6667	1,4372	28	0,1617	15	15	0,7037	0,8165	1,3462	0,5856
		T30 vs T50	**3,2667**	**2,6667**	**2,1558**	**28**	**0,0398**	**15**	**15**	**0,7037**	**0,8165**	**1,3462**	**0,5856**
		CT0 vs CT30	2,8667	3,1333	-0,9826	28	0,3342	15	15	0,8338	0,6399	1,6977	0,3335
	EQUILÍBRIO	T0 vs T30	2,8667	3,1333	-0,8759	28	0,3886	15	15	0,6399	0,9904	2,3953	0,1138
		T0 vs T50	2,8667	2,5333	1,2283	28	0,2296	15	15	0,6399	0,8338	1,6977	0,3335
		T30 vs T50	3,1333	2,5333	1,7949	28	0,0835	15	15	0,9904	0,8338	1,4110	0,5279

Tabela 13: (continuação).

PARAMETRO	AMOSTRAS	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1	Std.Dev. Group 2	F-ratio Variances	p Variances
CORPO	CT0 vs CT30	2,6000	3,0667	-1,4924	28	0,1468	15	15	0,9103	0,7988	1,2985	0,6317
	T0 vs T30	2,9333	2,8667	0,2236	28	0,8247	15	15	0,7988	0,8338	1,0896	0,8748
	T0 vs T50	2,9333	2,6000	1,1880	28	0,2448	15	15	0,7988	0,7368	1,1754	0,7665
	T30 vs T50	2,8667	2,6000	0,9282	28	0,3612	15	15	0,8338	0,7368	1,2807	0,6498
PERSISTÊNCIA	CT0 vs CT30	2,9333	3,0000	-0,2017	28	0,8416	15	15	1,0998	0,6547	2,8222	0,0619
	T0 vs T30	2,7333	3,0667	-1,2127	28	0,2354	15	15	0,7037	0,7988	1,2885	0,6418
	T0 vs T50	2,7333	2,8667	-0,5429	28	0,5915	15	15	0,7037	0,6399	1,2093	0,7271
	T30 vs T50	3,0667	2,8667	0,7568	28	0,4555	15	15	0,7988	0,6399	1,5581	0,4169
FIM DE PROVA	CT0 vs CT30	3,0000	3,3333	-1,0000	28	0,3259	15	15	0,8452	0,9759	1,3333	0,5976
	T0 vs T30	3,0000	2,8000	0,6757	28	0,5048	15	15	0,7559	0,8619	1,3000	0,6302
	T0 vs T50	3,0000	2,5333	1,8249	28	0,0787	15	15	0,7559	0,6399	1,3953	0,5413
	T30 vs T50	2,8000	2,5333	0,9621	28	0,3442	15	15	0,8619	0,6399	1,8140	0,2772
SOMAS PARCIAIS	CT0 vs CT30	3,0667	3,0000	0,2348	28	0,8161	15	15	0,7988	0,7559	1,1167	0,8393
	T0 vs T30	17,6667	18,1333	-0,3885	28	0,7006	15	15	2,8950	3,6423	1,5830	0,4006
	T0 vs T50	17,6667	16,0667	1,5021	28	0,1443	15	15	2,8950	2,9391	1,0307	0,9557
	T30 vs T50	18,1333	16,0667	1,7102	28	0,0983	15	15	3,6423	2,9391	1,5358	0,4321
APRECIAÇÃO GLOBAL	CT0 vs CT30	17,7333	18,8667	-0,8205	28	0,4189	15	15	4,0965	3,4407	1,4175	0,5224
	T0 vs T30	17,6667	18,1333	-0,3885	28	0,7006	15	15	2,8950	3,6423	1,5830	0,4006
	T0 vs T50	17,6667	16,0667	1,5021	28	0,1443	15	15	2,8950	2,9391	1,0307	0,9557
	T30 vs T50	18,1333	16,0667	1,7102	28	0,0983	15	15	3,6423	2,9391	1,5358	0,4321
	CT0 vs CT30	17,7333	18,8667	-0,8205	28	0,4189	15	15	4,0965	3,4407	1,4175	0,5224