

Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Daniela Sofia Rodrigues Martins

**Otimização de fermentações
sequenciais com duas leveduras
do género *Saccharomyces***

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho Efetuado sob a orientação do

**Professor Doutor José Maria Oliveira
e da**

Mestre Isabel Araújo

(Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura, Lda.)

DECLARAÇÃO

Nome:

Daniela Sofia Rodrigues Martins

Título da dissertação:

Otimização de fermentações sequenciais com duas leveduras do género *Saccharomyces*

Orientadores:

Professor Doutor José Maria Oliveira

Mestre Isabel Araújo

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado:

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica – Ramo Tecnologia Química e Alimentar

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, 11/12/2015

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Mestre Isabel Araújo da Vinalia pela confiança e pela oportunidade do estágio curricular.

Ao orientador, Professor José Maria Oliveira da Universidade do Minho, por me ter acompanhado durante todo o trabalho e incentivado a fazer sempre melhor.

À Eng.^a Eugénia Vieira e ao Mestre João Drumonde-Neves da Vinalia, por me ajudarem ao longo da execução do trabalho e ao mesmo tempo me darem espaço para tomar decisões, aceitando a minha opinião.

À Doutora Zlatina Genisheva pelo tempo que dispensou para ajudar na análise aos compostos voláteis do aroma, e aos restantes investigadores do Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar, do Centro de Engenharia Biológica.

À minha família e amigos mais próximos pelo apoio incondicional em toda a jornada que foi a minha formação académica.

RESUMO

A inoculação do mosto de uvas com leveduras puras selecionadas, normalmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, é uma prática recorrente que permite uma fermentação rápida e eficiente. Apesar destas vantagens, a utilização generalizada de uma única espécie de levedura contribui para a uniformização dos vinhos. Para contrariar esta tendência e apresentar produtos mais diversificados e complexos organolepticamente, têm sido investigadas novas técnicas de fermentação e leveduras não convencionais. O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação de uma destas técnicas, a fermentação sequencial com duas leveduras do género *Saccharomyces* com características fermentativas distintas. Primeiro foi inoculada uma estirpe de *S. uvarum* com elevada atividade β -glucosidásica e em seguida, a diferentes densidades do mosto em fermentação, uma estirpe de *S. cerevisiae* com tolerância a altas concentrações de etanol.

As fermentações foram realizadas numa estação piloto com cubas de 20 L; a massa volúmica e a temperatura foram monitorizadas diariamente, e foram retiradas amostras do mosto em fermentação. Nos vinhos finais determinou-se a acidez total e volátil, o pH e o título alcoométrico com o equipamento OenoFoss™, e os açúcares e glicerol foram doseados por HPLC. As análises aos compostos voláteis do aroma maioritários foram feitas por GC-FID, e aos minoritários por GC-MS. Foram aplicadas técnicas de microbiologia para isolar e fazer crescer as colónias de leveduras recolhidas ao longo da fermentação, e diferentes técnicas de PCR para identificar as leveduras e compará-las com os controlos. Finalmente, foi feita uma prova organoléptica dos vinhos produzidos.

A baixa densidade inicial do mosto condicionou as etapas de inoculação e o título alcoométrico final dos vinhos produzidos, que ficou abaixo dos 8.5 %. As fermentações sequenciais foram mais lentas, e os vinhos produzidos desta forma terminaram com menor teor alcoólico, maior acidez e maior concentração de glicerol do que o vinho produzido com o inóculo de *S. cerevisiae* pura. Quando inoculadas em simultâneo, a estirpe de *S. cerevisiae* dominou a fermentação, mas não reprimiu totalmente o crescimento de *S. uvarum*. Esta produziu maior quantidade de 2-feniletanol e acetato de 2-feniletilo, e como tal os vinhos produzidos por fermentação sequencial apresentaram um aroma floral e a rosas. A maior acumulação destes compostos ocorreu no ensaio onde a inoculação com a segunda levedura foi feita mais cedo, e nos ensaios seguintes houve menor produção de aromas fermentativos. A fermentação sequencial com as duas leveduras testadas mostrou-se viável e produziu vinhos aprovados pelo painel de provadores.

ABSTRACT

Inoculation of grape must with pure selected yeasts, usually of the species *Saccharomyces cerevisiae*, is a recurring practice that allows a fast and effective fermentation. Despite these advantages, the widespread use of a single species of yeast contributes to the standardization of wines. To counter this trend and present more diverse and organoleptically complex products, new fermentation techniques and non-conventional yeasts have been investigated. The main purpose of this work was to assess one of these techniques, the sequential fermentation with two yeasts of the *Saccharomyces* genus with different fermentation profiles. Initially it was inoculated a strain of *S. uvarum* with high β -glucosidase activity, and then, at different densities of the fermenting must, a strain of *S. cerevisiae* tolerant to high concentrations of ethanol.

Fermentations were performed in a pilot plant with 20 L tanks; density and temperature were monitored daily and samples of the fermenting must were collected. In the finished wines, total and volatile acidity, pH and the alcoholic strength were determined with OenoFoss™, and sugars and glycerol were measured by HPLC. Major volatile aroma compounds were analyzed by GC-FID and minor volatiles by GC-MS. Microbiological techniques were applied to isolate and grow colonies of the yeasts collected throughout the fermentation, and several PCR techniques were applied to identify yeasts and comparing them with the controls. Finally, it was made an organoleptic exam of the produced wines.

The low initial density of the must conditioned the steps of inoculation and the final alcoholic strength of the produced wines, which was below 8.5 %. The sequential fermentations were slower, and the wines produced in this way ended with lower alcohol content, higher acidity and higher glycerol concentration than wine produced with a pure culture of *S. cerevisiae*. When inoculated simultaneously, the *S. cerevisiae* strain dominated the fermentation, but did not completely suppress the growth of *S. uvarum*. The latter produced a larger amount of 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate, so the wines produced by sequential fermentation exhibited a floral and rose like aroma. The greatest accumulation of these compounds occurred in the trial where the second yeast inoculation was done earlier, and in the following trials there was lower production of fermentative aromas. The sequential fermentation with both tested yeasts proved to be feasible and produced wines appreciated by the tasting panel.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Índice.....	vii
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xi
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	xiii
1. Motivação e Objetivos.....	1
2. Introdução.....	3
2.1 A empresa: Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura.....	3
2.2 A fermentação e o papel das leveduras de vinificação.....	4
2.2.1 Fermentação Natural.....	4
2.2.2 Fermentação com leveduras puras selecionadas.....	6
2.2.3 Fermentação com culturas mistas de leveduras.....	8
2.2.4 Fermentação Sequencial.....	11
2.2.5 Relações e características das principais leveduras do género <i>Saccharomyces</i>	12
2.2.6 Particularidades da vinificação em branco.....	13
2.3 O aroma do vinho.....	14
2.3.1 Aroma Varietal.....	15
2.3.2 Aroma fermentativo.....	17
2.3.3 Precursores de aroma.....	21
2.4 Fundamentos das técnicas utilizadas.....	23
2.4.1 O equipamento OenoFoss™.....	23
2.4.2 Técnicas moleculares.....	24
2.4.3 A prova organolética.....	26
3. Materiais e Métodos.....	29
3.1 Preparação do meio e dos inóculos de levedura.....	29
3.2 Preparação e inoculação do mosto.....	30

3.3	Monitorização da fermentação.....	31
3.4	Análises físico-químicas.....	32
3.4.1	Massa volúmica e álcool provável.....	32
3.4.2	Análises ao mosto inicial, mosto em fermentação e vinhos com o OenoFoss™.....	33
3.4.3	Doseamento de açúcares e glicerol nos vinhos por HPLC.....	33
3.5	Análises microbiológicas.....	33
3.5.1	Isolamento e repicagem.....	34
3.5.2	Extração do DNA.....	34
3.5.3	PCR interdelta.....	35
3.5.4	PCR-RFLP das regiões ITS e do gene 5.8S.....	36
3.5.5	PCR da região D1/D2 do gene 26S e sequenciação.....	37
3.6	Análise sensorial.....	37
3.7	Análise aos compostos voláteis do aroma.....	39
3.7.1	Compostos voláteis maioritários.....	39
3.7.2	Compostos voláteis minoritários.....	40
4.	Resultados e Discussão.....	41
4.1	Características do mosto.....	41
4.2	Acompanhamento dos ensaios de fermentação.....	44
4.2.1	Alterações químicas do mosto em fermentação.....	44
4.2.2	Evolução da população de leveduras.....	47
4.3	Características dos vinhos finais.....	52
4.3.1	Composição química.....	52
4.3.2	Características organoléticas.....	54
4.3.3	Compostos voláteis do aroma.....	56
5.	Conclusões.....	63
	Referências Bibliográficas.....	65
	Anexo I – Curvas de calibração utilizadas nas determinações por HPLC.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Reação de formação de um éster (acetato de etilo) a partir de um ácido (acético) e um álcool (etanol).....	20
Figura 2 – Mecanismo de atuação das diferentes enzimas envolvidas na hidrólise dos precursores glicosilados.....	22
Figura 3 – Equipamento OenoFoss™	24
Figura 4 – Esquema da organização dos genes de rDNA (<i>SSU</i> – <i>Small Subunit</i> ; <i>LSU</i> – <i>Large Subunit</i>); a vermelho: zona de ligação dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4 para amplificação das regiões ITS e do gene 5.8S; a azul: zona de ligação dos <i>primers</i> NL1 e NL4 para amplificação da região D1/D2 do gene 26S.....	25
Figura 5 – Representação esquemática dos ensaios realizados, com as etapas de inoculação das leveduras Y2 e Y59 nas fermentações sequenciais (<i>t</i> – tempo).	30
Figura 6 – Representação esquemática dos momentos em que foram retiradas amostras com biomassa do mosto em fermentação, nos diferentes ensaios (<i>t</i> – tempo).....	32
Figura 7 – Ficha de prova descritiva simplificada para vinhos brancos.	38
Figura 8 – Representação gráfica da variação da massa volúmica a 20 °C ($\rho_{20^{\circ}\text{C}}$) nos diferentes ensaios em função do tempo de fermentação (<i>t</i>).	45
Figura 9 – Perfil da variação da concentração média de açúcares ($C_{\text{Glu+Fru}}$) nos diferentes ensaios em função do tempo de fermentação (<i>t</i>).	46
Figura 10 – Variação do título alcoométrico volúmico (<i>TAI</i>) nos diferentes ensaios, em função do tempo de fermentação (<i>t</i>).	47
Figura 11 – Perfis de bandas obtidos depois da separação dos produtos do PCR realizado com os <i>primers</i> $\delta 2$ e $\delta 12$, visualizados sob luz UV (M – marcador de pesos moleculares; pb – pares de bases).	48
Figura 12 – Perfis de bandas visualizados com luz UV após restrição, com as enzimas <i>Hinf</i> I e <i>Hae</i> III, dos fragmentos obtidos por PCR com os <i>primers</i> ITS1 e ITS4.	49
Figura 13 – Fragmento obtido por PCR do genoma da levedura Y2 com os <i>primers</i> NL1 e NL4.....	50
Figura 14 – Representação esquemática da percentagem de Implementação da Estirpe (<i>IE</i>) nos diferentes ensaios realizados, no meio (A) e no final da fermentação (B).....	51
Figura 15 – Resultado das <i>MG</i> calculadas para os descritores gustativos dos diferentes vinhos, avaliados pelo painel de provadores durante a análise sensorial.	55

Figura 16 – Resultado das *MG* calculadas para os descritores olfativos dos diferentes vinhos, avaliados durante a análise sensorial. 56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Álcoois monoterpénicos e descritores aromáticos associados.....	16
Tabela 2 – Álcoois superiores mais relevantes e descritores aromáticos associados.....	18
Tabela 3 – Ácidos gordos voláteis mais frequentes nos vinhos e descritores aromáticos associados...	19
Tabela 4 – Principais ésteres encontrados nos vinhos e descritores aromáticos associados.....	20
Tabela 5 – Principais parâmetros físico-químicos do mosto utilizado, determinados com o OenoFoss™, e respetivos erros calculados para 95 % de confiança.....	41
Tabela 6 – Resultados das análises feitas aos vinhos finais, com os respetivos erros calculados para 95 % de confiança.....	53
Tabela 7 – Concentrações médias (<i>C</i>) dos compostos voláteis maioritários detetados nos vinhos por análise semiquantitativa com GC-FID, erros calculados para 95 % de confiança e <i>LPO</i> para cada composto.....	57
Tabela 8 – Concentrações médias (<i>C</i>) dos compostos voláteis minoritários detetados nos vinhos por análise semiquantitativa com GC-MS, erros calculados para 95 % de confiança e <i>LPO</i> para cada composto.....	59

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Variáveis

ρ — Massa volúmica aparente

$\rho_{20^{\circ}\text{C}}$ — Massa volúmica a 20 °C

AAN — *Alpha Amino Nitrogen*, azoto com grupo α -amino

AP — Álcool Provável

AT — Acidez Total, expressa em ácido tartárico

AV — Acidez volátil, expressa em ácido acético

C — Concentração média

$C_{\text{Ác. Tartárico}}$ — Concentração de ácido tartárico

$C_{\text{Ác. Málico}}$ — Concentração de ácido málico

C_{Fru} — Concentração de frutose

$C_{\text{Glu+Fru}}$ — Concentração de glucose+frutose

C_{Gluc} — Concentração de glucose

C_{Gli} — Concentração de glicerol

$C_{\text{NH}_4^+}$ — Concentração de azoto amoniacal

DO — Densidade Ótica

FCR — Força Centrifuga Relativa

IE — Taxa de Implementação da Estirpe

LPO — Limiar de Perceção Olfativa

MG — Média Geométrica

SST — Sólidos Solúveis Totais

TAV — Título Alcoométrico Volúmico

Siglas e abreviaturas

BLAST — *Basic Local Alignment Search Tool*, ferramenta de procura de alinhamentos locais

DNA — *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

dNTPs — *deoxynucleotide triphosphates*, desoxinucleótidos trifosfato

FTIR — *Fourier Transform InfraRed Spectroscopy*, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GC-FID — *Gas Chromatography - Flame Ionization Detector*, cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama

GC-MS — *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*, Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa

HPLC — *High Performance Liquid Chromatography*, cromatografia líquida de alta eficiência

ITS — *Internal Transcribed Spacer*, espaçador transcrito interno.

NTS — *Non Transcribed Spacer*, espaçador não transcrito.

pb — pares de bases

PCR — *Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase

pPCR — produto de PCR

rDNA — DNA ribossomal

RFLP — *Restriction Fragments Length Polymorphism*, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

RNA — *Ribonucleic Acid*, ácido ribonucleico

rRNA — RNA ribossomal

UV — Ultra Violeta

U — Unidade de atividade enzimática (não pertence ao Sistema Internacional de unidades), definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o substrato a uma velocidade reacional de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$

YEPD — *Yeast Extract Peptone Dextrose*, extrato de levedura peptona e dextrose

1. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

O vinho é o produto obtido por fermentação alcoólica de um mosto de uvas. As leveduras são os microrganismos responsáveis pela conversão dos açúcares do mosto em etanol e compostos do gosto e aroma presentes no vinho acabado. Entre as leveduras de vinificação, a *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada por apresentar maior resistência ao etanol, garantir o arranque rápido da fermentação e não causar desvios no processo.

A diversidade de vinhos e o número de marcas existentes no mercado é enorme, assim como a necessidade de ter um fator de diferenciação no produto, para que este se destaque em relação à concorrência. Atualmente tem havido um aumento da produção mundial de vinho, assim como uma tendência dos consumidores para a procura de novos produtos, mais diversificados, o que estimulou a pesquisa e desenvolvimento de novas práticas de vinificação na tentativa de satisfazer esta procura.

No processo natural de fermentação de um mosto de uvas, geralmente predominam numa fase inicial leveduras com baixa tolerância para o etanol; depois de poucos dias, tornam-se dominantes outras leveduras, mais resistentes, que dão continuidade à fermentação até se atingir o título alcoométrico pretendido. A presença de uma grande diversidade de leveduras, com todos os produtos principais e secundários que são excretados, dá uma maior complexidade organoléptica ao vinho final. Mas se o processo fermentativo ocorrer de forma espontânea, sem controlo, pode ficar sujeito a paragens ou ao aparecimento de compostos indesejáveis. É por isso que atualmente se faz a inoculação do mosto com leveduras selecionadas, normalmente da espécie *S. cerevisiae*, que permitem uma fermentação controlada. Um senão deste método é a perda de complexidade e a uniformização dos vinhos a nível global. Para contornar isto há a possibilidade de se fazer uma inoculação com culturas mistas de leveduras, ou então inoculação sequencial.

Mesmo dentro do género *Saccharomyces* existe bastante diversidade: há leveduras que produzem bastantes compostos aromáticos de interesse, mas são pouco tolerantes ao etanol e não conseguem, por si só, levar a fermentação até ao final; outras estirpes são muito resistentes, mas dão origem a vinhos mais pobres em termos sensoriais. O propósito da fermentação sequencial é reunir estes dois tipos de leveduras, inocular primeiro a menos resistente e, antes que a fermentação cesse introduzir a mais resistente, para que no final se consiga um vinho com a quantidade necessária de álcool, e com um perfil sensorial mais complexo.

O estágio curricular que conduziu a este trabalho de Dissertação foi realizado na empresa Vinalia – Soluções de biotecnologia para a vitivinicultura, sob o tema “Otimização de fermentações sequenciais com duas leveduras do género *Saccharomyces*”. Os objetivos inerentes ao trabalho desenvolvido foram a realização de fermentações sequenciais à escala piloto com duas leveduras do género *Saccharomyces*, Y2 (com elevada atividade β -glucosidase) e Y59 (elevada tolerância ao etanol), otimização do processo por inoculação do mosto a diferentes densidades, e a avaliação físico-química e sensorial dos diferentes vinhos produzidos.

Ambas as leveduras utilizadas neste projeto fazem parte da coleção da YeastWine e já tinham sido testadas em separado. O comportamento distinto que apresentaram em condições de fermentação levou ao interesse de as testar em fermentação sequencial, tentando incorporar num único vinho o melhor que ambas poderiam proporcionar.

2. INTRODUÇÃO

Este trabalho está dividido em 5 secções principais. Na primeira secção já foi apresentado o tema do trabalho e os principais objetivos. Nesta secção de Introdução é apresentada a empresa onde foi realizado o trabalho, é feita uma revisão bibliográfica sobre as leveduras envolvidas na produção artesanal e industrial de vinho e as diferentes técnicas de inoculação, fala-se um pouco sobre as particularidades das leveduras testadas e da fermentação de mostos de vinhos brancos; são referidos sucintamente alguns dos principais compostos do aroma presentes nos vinhos jovens; finalmente são explicados os fundamentos de algumas das técnicas utilizadas. Na secção de Materiais e Métodos são descritas pormenorizadamente todas as metodologias utilizadas no decorrer das fermentações, na recolha e análise de amostras e na análise sensorial dos vinhos. Na quarta secção são apresentados todos os dados e resultados obtidos, com uma explicação dos mesmos e comparação de valores com a literatura. Finalmente, na última secção dá-se maior relevo às principais conclusões retiradas em todo o trabalho e são definidas perspetivas a adotar em experiências futuras.

2.1 A empresa: Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura

A oportunidade para o estágio curricular foi proposta pela empresa Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a vitivinicultura, um *Spin-Off* académico da Universidade do Minho criado em 2006, que conta com o apoio de Professores e investigadores da mesma como mentores científicos. Como interlocutor pluridisciplinar em investigação e desenvolvimento para o setor vitivinícola, a Vinalia disponibiliza uma vasta gama de serviços para os produtores de vinhos: consultoria com vista à otimização da qualidade das uvas, das vinificações, e da estabilização e conservação de vinhos; análises químicas, físicas e microbiológicas dos vinhos; análise sensorial, e ainda estudos de mercado. A empresa organiza também formações à medida das necessidades das empresas ou associações, como é o exemplo de cursos à iniciação da prova de vinhos (<http://www.vinalia.com.pt/>).

O trabalho experimental foi realizado nas instalações da YeastWine – Wine solutions, Lda., uma empresa fundada em 2011 que se ocupa com o isolamento e investigação de leveduras com propriedades únicas, que possam ser utilizadas no setor dos vinhos como uma mais-valia para a diferenciação e valorização do produto (<http://www.yeastwine.com/>). A empresa possui uma estação piloto com 12 fermentadores de 20 L cada, com acoplamento de sensores para monitorizar em tempo real os parâmetros mais

significativos da fermentação. Com o auxílio deste equipamento e de um laboratório de genética, é possível testar diferentes leveduras ou condições de fermentação em simultâneo, reduzindo desperdícios. A empresa oferece serviços como a identificação das espécies de leveduras presentes nas uvas, mosto e vinho, a caracterização enológica das mesmas, identificação de leveduras de contaminação, testes à escala piloto, produção de fermentos selecionados em pequena escala e ainda a sua conservação. Podem ser também feitas análises físico-químicas aos vinhos, assim como análise sensorial (cor, aroma e sabor) por um painel treinado de provadores.

Para explorar o potencial enológico das leveduras autóctones, a YeastWine detém hoje cerca de 60 variedades de fermentos, oriundos de diversas regiões do país, prontos para serem disponibilizados ao mercado, oferecendo ainda a possibilidade de recolher as leveduras junto do viticultor. Tudo isto contribui para que o cliente possa escolher a levedura mais adequada ao tipo de vinho que pretende produzir, aquela que confere as características mais desejáveis ou diferenciadoras.

2.2 A fermentação e o papel das leveduras de vinificação

O vinho, segundo a definição da União Europeia que consta no Regulamento CE N.º 491/2009, é um produto obtido exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas ou mosto de uvas. As castas de uvas que podem ser utilizadas na produção de vinho devem pertencer à espécie *Vitis vinifera*, ou ser provenientes de um cruzamento entre esta e outra espécie do género *Vitis*, salvo exceções previstas no mesmo regulamento.

A fermentação alcoólica é um processo complexo que envolve uma série de reações bioquímicas, e que ocorre por ação de microrganismos presentes no próprio substrato. Estes podem afetar a qualidade do produto final de várias formas, ao longo de todas as etapas da vinificação: durante a maturação das uvas, ao longo da fermentação alcoólica e mais tarde durante o envelhecimento. As leveduras são os principais contribuintes para a qualidade do vinho, uma vez que são elas que realizam a fermentação alcoólica do mosto, transformando os açúcares da uva em etanol, dióxido de carbono e centenas de outros metabolitos secundários que, em conjunto, contribuem para o gosto e aroma característicos do vinho (Ciani *et al.*, 2010; Fleet, 2003; Romano *et al.*, 2003; Saberi *et al.*, 2012).

2.2.1 Fermentação Natural

As películas das uvas maduras são um meio não estéril, e possuem uma grande biodiversidade microbiana. Após o esmagamento das uvas e das películas, são transferidos para o mosto diversos

fungos e bactérias, e em particular várias espécies de leveduras com capacidade para realizar uma fermentação espontânea (Ciani *et al.*, 2010; Perrone *et al.*, 2013; Romano *et al.*, 2003; Saberi *et al.*, 2012).

Durante a fermentação natural do mosto podem estar presentes vários géneros e espécies de leveduras, que interagem entre si e operam simultânea ou sucessivamente (Barrajón *et al.*, 2011; Ciani *et al.*, 2010; Fleet, 2003; Romano *et al.*, 2003). Nos primeiros estágios da fermentação predominam leveduras apiculadas, com capacidade fermentativa moderada, dos géneros *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Metschnikowia* e *Candida*, e por vezes ainda *Pichia* e *Kluyveromyces* (Ciani *et al.*, 2006; Fleet, 2003; Medina *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2010). Depois de 3 ou 4 dias (Ciani *et al.*, 2010), e à medida que a matriz do mosto se altera e começa a tornar em vinho, estas leveduras perdem atividade e são substituídas por leveduras elípticas, da espécie *S. cerevisiae* (Ciani *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2013), que assumem o controlo do processo de fermentação até que este esteja terminado.

Apesar de nas películas da uva e nas primeiras fases da fermentação a *S. cerevisiae* não estar presente em grande quantidade (geralmente ocorre em populações com número de unidades formadoras de colónias inferior a 100 g^{-1} , e em alguns estudos não se conseguiu isolar esta espécie a partir das uvas), o facto de surgir sempre em todas as fermentações e a sua capacidade para dominar as etapas intermediárias e finais do processo levaram a que fosse considerada a principal levedura de vinificação (Andorrà *et al.*, 2012; Beltran *et al.*, 2002; Capece *et al.*, 2013; Romano *et al.*, 2003).

A produção de etanol por *S. cerevisiae* é considerado um dos principais fatores que condiciona o crescimento de espécies não-*Saccharomyces* durante a fermentação. A evolução sequencial das espécies de leveduras é em grande parte determinada pela sua suscetibilidade ao aumento da concentração em etanol no mosto em fermentação (Capece *et al.*, 2013; Ciani e Comitini, 2015; Fleet, 2003). As leveduras que não pertencem ao género *Saccharomyces* morrem mais cedo porque são mais sensíveis ao etanol, e geralmente não tolerantes a concentrações deste composto que ultrapassem os 5 % a 7 % (Capece *et al.*, 2013; Ciani e Comitini, 2015; Fleet, 2003).

As diferentes estirpes de *S. cerevisiae* sobrevivem e predominam nos últimos estágios da fermentação devido à sua elevada resistência ao etanol, que é também o principal produto do seu metabolismo (Cheraiti *et al.*, 2005). Dentro desta espécie, distintas estirpes apresentam diferentes tolerâncias ao etanol e outros compostos, pelo que este é também um fator que condiciona o crescimento sequencial de estirpes de leveduras da mesma espécie (Fleet, 2003).

Na verdade, dentro do ecossistema vinho, existem numerosos mecanismos através dos quais uma levedura pode influenciar o crescimento de outras espécies (Fleet, 2003). Além do etanol, outros compostos produzidos pelas leveduras durante a fermentação podem tornar-se inibitórios para outras espécies ou estirpes de leveduras, exercendo no meio uma pressão seletiva (Ciani e Comitini, 2015). São exemplos o ácido acético, ácidos gordos de cadeia média e acetaldeído; algumas proteínas e péptidos também apresentam propriedades antimicrobianas, e pode ainda haver produção de toxinas e enzimas que destroem as paredes celulares de determinadas espécies de microrganismos (Ciani e Comitini, 2015; Fleet, 2003).

O mosto de uvas, devido à sua composição, constitui um meio seletivo onde o crescimento das leveduras pode também ser influenciado pela competição por nutrientes, como açúcares, azoto, sais minerais e oxigénio (Ciani e Comitini, 2015; Perrone *et al.*, 2013). O crescimento inicial de leveduras diminui o conteúdo em nutrientes do mosto, tornando-o um ambiente menos favorável para o desenvolvimento de novas espécies microbianas (Fleet, 2003). *S. cerevisiae* é altamente eficiente na conversão de fontes nutricionais em biomassa, o que pode representar a razão para o seu sucesso nas fermentações industriais (Andorrà *et al.*, 2012; Perrone *et al.*, 2013). Existem ainda outros fenómenos que podem influenciar o crescimento sequencial das leveduras ao longo da fermentação, como a temperatura e a densidade celular, uma vez que o contacto entre células de diferentes espécies (ou mesmo diferentes estirpes dentro da mesma espécie) pode despoletar mecanismos de competição ou proteção (Capece *et al.*, 2013; Ciani e Comitini, 2015; Perrone *et al.*, 2013).

Em suma, a forte capacidade competitiva das leveduras *S. cerevisiae* deve-se a uma combinação de propriedades, tais como um crescimento rápido, o consumo eficiente de glucose e outros nutrientes, boa capacidade de produção e tolerância ao etanol (Andorrà *et al.*, 2012; Perrone *et al.*, 2013). Estes fatores aplicam-se também na competição existente entre estirpes da mesma espécie (Perrone *et al.*, 2013).

2.2.2 Fermentação com leveduras puras seleccionadas

Tradicionalmente a fermentação alcoólica do vinho era realizada pelas leveduras indígenas da uva, o que muitas vezes resultava em fermentações lentas, crescimento de microrganismos de alteração, formação de compostos indesejáveis ou mesmo paragens na fermentação, o que tornava a vinificação um processo arriscado e com baixa fiabilidade (Ciani *et al.*, 2010; Raynal *et al.*, 2009). Há, de facto, evidências de que o controlo microbiológico do processo de fermentação permite uma melhor gestão da fermentação alcoólica (Comitini *et al.*, 2011). Por esta razão, e para assegurar uma fermentação controlada e mais confiável, foram introduzidas no mercado culturas de leveduras seleccionadas, sob a forma de levedura

seca ativa, para serem utilizadas como culturas de arranque para a fermentação alcoólica do mosto (Cheraiti *et al.*, 2005; Saberi *et al.*, 2012). Estes fermentos são, na sua maioria, estirpes puras de *S. cerevisiae*, já que esta levedura (quando inoculada em quantidade suficiente) domina o processo de fermentação e suprime o crescimento das leveduras nativas não-*Saccharomyces* do mosto, além de ser mais resistente a agentes antissépticos como o SO₂ (Ciani *et al.*, 2010; Comitini *et al.*, 2011; Medina *et al.*, 2013; Ortiz *et al.*, 2013; Romano *et al.*, 2003).

A inoculação do mosto com uma cultura selecionada de *S. cerevisiae* foi sendo introduzida na indústria vinícola como uma forma de aumentar o controlo do processo, garantir uma fermentação suave, rápida e sem desvios, reduzir o risco de defeitos organoléticos resultantes do crescimento e metabolismo de certas leveduras indígenas, obter vinhos com as características desejadas e com qualidade consistente (Andorrà *et al.*, 2012; Barrajon *et al.*, 2011; Cheraiti *et al.*, 2005; Ciani *et al.*, 2010; Ciani e Comitini, 2015; Raynal *et al.*, 2009; Romano *et al.*, 2003). Com a disponibilidade comercial de culturas secas ativas de *S. cerevisiae*, a inoculação do mosto tornou-se atrativa e conveniente, e como tal, no presente é uma prática difundida (Ciani *et al.*, 2010).

Além de assegurar o controlo microbiológico da fermentação, a inoculação com uma estirpe particular também pode ter como objetivo a obtenção de características específicas no produto final (um determinado teor alcoólico, uma aroma particular, menor acidez, etc.). Para tal é necessário que a estirpe inoculada apresente um crescimento rápido, capaz de competir com as leveduras nativas e dominar a fermentação, para que se obtenham os efeitos desejados no vinho produzido. Só quando a predominância é garantida é que a cultura de arranque inoculada pode produzir o efeito desejado no produto final: como já referido neste capítulo, a *S. cerevisiae* possui as características necessárias para se sobrepôr e assumir o controlo da fermentação alcoólica (Andorrà *et al.*, 2012; Capece *et al.*, 2013; Perrone *et al.*, 2013), e certas estirpes têm capacidade para dominar sobre outras da mesma espécie.

Embora as leveduras indígenas da uva (na sua maioria espécies não-*Saccharomyces*) não sejam as mais adequadas para a realização de fermentação alcoólica (Raynal *et al.*, 2009), estudos têm demonstrado que estas não são totalmente suprimidas nas primeiras fases da fermentação, e enquanto competem com a cultura inoculada também libertam certos metabolitos de interesse, que podem contribuir para a qualidade do produto final (Capece *et al.*, 2013; Medina *et al.*, 2013).

As fermentações inoculadas com leveduras puras não-*Saccharomyces*, por si só, na maior parte das vezes não são viáveis: estas leveduras têm capacidades fermentativas limitadas (taxas de fermentação

baixas, baixa resistência ao etanol, o que resulta muitas vezes em paragens antes do final expectável da fermentação), produzem metabolitos indesejáveis, têm baixa resistência ao SO₂ e são pouco competitivas em condições enológicas (Andorrà *et al.*, 2012; Ciani *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010). Estas leveduras só devem ser utilizadas como culturas de arranque em conjunto com estirpes de *S. cerevisiae* fortemente fermentativas, garantindo assim a conclusão do processo (Rodríguez *et al.*, 2010).

O uso generalizado de estirpes selecionadas de *S. cerevisiae* é uma simplificação da diversidade microbiológica do mosto, e limita não só o desenvolvimento de organismos de alteração, mas também o de espécies e estirpes que poderiam contribuir positivamente para o aroma e singularidade de um vinho (Barrajón *et al.*, 2011; Ciani *et al.*, 2010). A utilização de monoculturas para inoculação do mosto resulta na padronização das propriedades analíticas e sensoriais do vinho, diminuindo a complexidade do produto (Cheraiti *et al.*, 2005; Ciani *et al.*, 2010).

2.2.3 Fermentação com culturas mistas de leveduras

A fermentação conduzida com a flora natural do mosto conduz a resultados imprevisíveis; por outro lado, a utilização de estirpes puras industriais pode resultar na perda de complexidade do vinho. Por estas razões, um processo alternativo ganhou interesse: a inoculação do mosto de uvas com várias estirpes diferentes de leveduras secas ativas (Cheraiti *et al.*, 2005; Saberi *et al.*, 2012; Sadoudi *et al.*, 2012).

O número limitado de estirpes de leveduras comerciais utilizados para a elaboração do vinho contribui para a produção de vinhos com estilos semelhantes e características uniformes em todo o mundo (Medina *et al.*, 2013; Saberi *et al.*, 2012). Acredita-se que os vinhos elaborados por inoculação de uma estirpe comercial de *S. cerevisiae* são menos complexos do que os produzidos por fermentação natural do mosto com as leveduras indígenas (Sadoudi *et al.*, 2012).

Nos últimos anos os consumidores têm procurado novos produtos, mais diversificados, o que estimulou a pesquisa e o desenvolvimento de novas práticas de vinificação na tentativa de responder a esta tendência e atrair um mercado mais amplo (Saberi *et al.*, 2012). Uma das tendências atuais é a fermentação controlada do mosto utilizando culturas de arranque mistas, compostas por uma ou mais leveduras de vinificação com uma combinação de boas propriedades fermentativas e elevada produção de compostos aromáticos e outros de interesse (Barrajón *et al.*, 2011; Ciani e Comitini, 2015; Clemente-Jimenez *et al.*, 2005; Fleet, 2003). Desta forma é possível superar a falta de complexidade dos vinhos produzidos por culturas puras de uma única levedura, e consegue-se melhorar as características particulares e específicas de muitos vinhos (Capece *et al.*, 2013; Ciani *et al.*, 2010).

Diversos estudos já descreveram fermentações alcoólicas de mostos de uvas (natural ou sintético) realizadas com culturas de arranque mistas com uma levedura não-*Saccharomyces* e com uma estirpe de *S. cerevisiae* (Andorrà et al., 2012; Ciani et al., 2006; Clemente-Jimenez et al., 2005; Comitini et al., 2011; Gobbi et al., 2013; Loira et al., 2014; Medina et al., 2013; Raynal et al., 2009; Rodriguez et al., 2010; Sadoudi et al., 2012), com duas leveduras do género *Saccharomyces* (Cheraiti et al., 2005; Howell et al., 2006), ou então duas estirpes diferentes de *S. cerevisiae* (Barrajón et al., 2011; Capece et al., 2013; Saberi et al., 2012). Regra geral, *S. cerevisiae* deve estar presente para garantir uma fermentação completa. Existem ainda duas formas de aplicar estes inóculos: de forma simultânea, ou aplicados sequencialmente (Clemente-Jimenez et al., 2005; Comitini et al., 2011).

Algumas espécies de leveduras que não pertencem ao género *Saccharomyces*, apesar de na sua maioria não terem uma tolerância ao etanol que lhes permita concluir a fermentação, também se mostram importantes para a qualidade de um vinho (Ortiz et al., 2013). Elas produzem grandes quantidades de metabolitos secundários que contribuem para o aroma, gosto e corpo do vinho, podendo melhorar o seu perfil sensorial (Andorrà et al., 2012; Ciani et al., 2010). Leveduras de vinificação não-*Saccharomyces* selecionadas podem ser utilizadas em associação com culturas de arranque de *S. cerevisiae* para alterar a composição química, melhorar a qualidade e complexidade do produto final (Comitini et al., 2011). De entre as leveduras não-*Saccharomyces* que têm sido estudadas em associação com *S. cerevisiae* destacam-se *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia fermentans*, *Hanseniaspora vineae*, *Candida pulcherrima*, *Kluyveromyces thermotolerans* e *Metschnikowia pulcherrima* (Andorrà et al., 2012; Ciani et al., 2006; Clemente-Jimenez et al., 2005; Comitini et al., 2011; Gobbi et al., 2013; Loira et al., 2014; Medina et al., 2013; Raynal et al., 2009; Rodriguez et al., 2010; Sadoudi et al., 2012).

Embora o crescimento de cada espécie de levedura de vinificação seja caracterizado por uma atividade metabólica específica e conhecida, dentro de cada espécie existe uma variabilidade significativa entre estirpes (Romano et al., 2003). Está bem estabelecido que, dentro de *S. cerevisiae*, diferentes estirpes têm diferentes efeitos sobre o sabor do vinho (Fleet, 2003; Molina et al., 2009). A produção de certos compostos que influenciam o aroma do vinho é afetada pela estirpe de levedura utilizada (Barrajón et al., 2011; Molina et al., 2009). Por esta razão estudos foram também feitos com diferentes estirpes da espécie *S. cerevisiae*, tanto em inoculação simultânea como introduzidas sequencialmente no mosto (Barrajón et al., 2011; Capece et al., 2013; King et al., 2010; Perrone et al., 2013; Saberi et al., 2012). Existem ainda, embora em menor quantidade, estudos feitos com diferentes espécies do género *Saccharomyces* (Cheraiti et al., 2005; Howell et al., 2006).

Atualmente já existem no mercado inóculos de arranque que contêm uma mistura de leveduras industriais com propriedades distintas, como é o caso dos produtos ZYMAFLORE® ALPHA TD N. SACCH., da empresa europeia Laffort, e do LEVEL2™ TD, produzido pela Lallemand no Canadá. Ambos contêm uma estirpe de *T. delbrueckii* e uma estirpe de *S. cerevisiae* (Loira *et al.*, 2014; Raynal *et al.*, 2009).

Os estudos já referidos provam que vinhos com culturas mistas ou sequenciais têm composição diferente dos vinhos produzidos por inoculação do mosto com estirpes puras. Mesmo que apenas uma das espécies domine no final da fermentação, as culturas mistas produzem maior quantidade de metabolitos secundários voláteis, que contribuem para uma maior complexidade e intensidade do aroma (Andorrà *et al.*, 2012; Barraón *et al.*, 2011; Medina *et al.*, 2013; Saberi *et al.*, 2012). Em determinados casos também se consegue uma melhoria no corpo do vinho (Medina *et al.*, 2013). De facto, a composição do vinho, e consequentemente a sua qualidade, pode ser melhorada por seleção e combinação de diferentes espécies ou estirpes, diferentes metodologias e taxas de inoculação (Comitini *et al.*, 2011).

Quando se analisam vinhos produzidos por culturas mistas, é intuitivo afirmar-se que estes apresentam perfis sensoriais distintos dos vinhos elaborados com uma cultura pura. O que também acontece é que quando se misturam vinhos produzidos por duas culturas puras em separado para tentar reproduzir um vinho produzido por essas duas leveduras em co-inoculação, o resultado não é o mesmo. Durante as fermentações mistas, as estirpes de levedura produzem um vinho caracterizado por uma combinação de substâncias diferente da dos vinhos obtidos por mistura de vinhos de estirpes individuais (Capece *et al.*, 2013; Ciani *et al.*, 2010; Howell *et al.*, 2006).

O sabor global do vinho resultante da fermentação de cultura mista não pode ser reproduzido por simples mistura de vinhos de culturas puras (Capece *et al.*, 2013). Este resultado sugere que as diferenças verificadas são devidas a interações metabólicas entre leveduras (Capece *et al.*, 2013; Ciani *et al.*, 2010; Comitini *et al.*, 2011; Howell *et al.*, 2006). Durante as fermentações mistas as interações entre diferentes leveduras afetam o metabolismo das espécies envolvidas, alterando o tipo de compostos ou a quantidade produzida (Andorrà *et al.*, 2012; Barraón *et al.*, 2011; Sadoudi *et al.*, 2012).

No entanto, as interações entre estirpes ou espécies em culturas mistas podem ter efeitos positivos ou negativos sobre as características organolépticas do vinho (Cheraiti *et al.*, 2005; Ciani e Comitini, 2015; Sadoudi *et al.*, 2012). Por exemplo, uma co-cultura de *Candida zemplinina* e de *S. cerevisiae* resultou numa menor concentração de compostos aromáticos (em comparação com vinho de uma cultura pura de *C. zemplinina*), o que sugere uma possível interação negativa entre estas duas leveduras

(Sadoudi *et al.*, 2012). Estas interações entre as estirpes de leveduras utilizadas e os potenciais efeitos sobre o produto final têm que ser testados e avaliados, para que se consigam selecionar leveduras com efeitos sinérgicos no perfil sensorial do vinho (Barrajón *et al.*, 2011; Cheraiti *et al.*, 2005).

Como referido anteriormente neste capítulo, um aspeto importante no delinear de uma fermentação com culturas mistas é a seleção de leveduras compatíveis, com interações positivas para o perfil sensorial do vinho. A temperatura de fermentação é outro fator a ter em conta, uma vez que influencia significativamente a produção da maioria dos compostos voláteis (Molina *et al.*, 2009). O perfil dos vinhos pode ainda variar com o tipo de mosto e com a escala a que é realizada a fermentação (Ciani e Comitini, 2015; Mateos *et al.*, 2006). A levedura em desenvolvimento interage com o substrato: isto tem que ser considerado na escolha de uma estirpe para uma variedade de uva ou mosto particular. Os resultados obtidos em ensaios laboratoriais também podem diferir das fermentações em grande escala (Rodríguez *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2003).

2.2.4 Fermentação Sequencial

A inoculação sequencial é uma forma de reproduzir o processo de fermentação natural de um mosto de uvas (Barrajón *et al.*, 2011; Ciani *et al.*, 2010; Loira *et al.*, 2014; Sadoudi *et al.*, 2012). É também uma forma de aumentar a complexidade do aroma do vinho, evitando os riscos associados à fermentação espontânea (Ciani *et al.*, 2010; Sadoudi *et al.*, 2012). Tal como na fermentação natural, na fermentação sequencial é inoculada e desenvolve-se primeiro uma levedura com menor tolerância ao etanol, que produz compostos de aroma ou paladar desejáveis, e em seguida uma estirpe de *S. cerevisiae* que termina a fermentação, produzindo no vinho um teor alcoólico adequado (Barrajón *et al.*, 2011). Comparando as várias modalidades de inoculação, a fermentação sequencial apresenta-se, muitas vezes, como a mais adequada para a combinação de estirpes diferentes (Rodríguez *et al.*, 2010).

A inoculação sequencial apresenta ainda uma outra vantagem: evita colocar as diferentes leveduras em competição entre si, pelo que cada uma consegue exprimir as suas qualidades sensoriais e fermentativas (Raynal *et al.*, 2009). Mesmo nesta condição, para se conseguirem vinhos com um perfil desejável é necessário escolher leveduras compatíveis, porque embora não interajam diretamente, os compostos libertados pela primeira podem inibir o crescimento da segunda, ou a atividade enzimática da segunda pode degradar os compostos de aroma produzidos pela primeira. Como consequência diferentes combinações devem ser testadas, a fim de determinar a melhor combinação capaz de melhorar a qualidade do vinho (Barrajón *et al.*, 2011).

2.2.5 Relações e características das principais leveduras do género *Saccharomyces*

O estatuto taxonómico das espécies do género *Saccharomyces* sofreu várias alterações ao longo dos anos, o que ainda gera alguma confusão (Fernández-Espinar *et al.*, 2000; Montrocher *et al.*, 1998; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). As técnicas convencionais para classificação de leveduras passavam pelo estudo das suas características morfológicas e fisiológicas, como a capacidade para fermentar diferentes fontes de carbono (melibiose, galactose, lactose, entre outras) ou crescer em meios seletivos (como meio de lisina) (Montrocher *et al.*, 1998; Pham *et al.*, 2011). Devido à grande proximidade entre algumas das espécies, estes métodos não eram suficientes para a sua diferenciação (Montrocher *et al.*, 1998).

Devido à coexistência de espécies do género *Saccharomyces* em fermentações, elas acabam por trocar material genético entre si, formando novas espécies que são híbridas de outras pré-existentes (Montrocher *et al.*, 1998; Nguyen e Gaillardin, 2005). Desta forma, a relação entre certas leveduras é muito próxima, não só a nível fisiológico mas também a nível molecular, e são necessárias técnicas muito específicas para se conseguir uma distinção evidente. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular tornou-se possível medir o nível de homologia do DNA, e com base nos novos dados foram feitas revisões taxonómicas (Fernández-Espinar *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Inicialmente (1952), *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. oviformis* e *S. bayanus* eram consideradas espécies distintas, juntamente com as restantes espécies pertencentes ao género *Saccharomyces*. Mais tarde (1970) foram integradas outras espécies no género *Saccharomyces*, e algumas espécies já existentes desapareceram ou foram integradas noutras, como foi o caso de *S. oviformis*, que passou a fazer parte de *S. bayanus*. Já em 1984 várias espécies foram agrupadas sob o nome *S. cerevisiae* (nomeadamente *S. bayanus* e *S. uvarum*), sendo consideradas como variedades desta espécie devido às suas semelhanças, embora tivessem capacidades de assimilação de açúcares diferentes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Mais tarde (2000), com base em dados de biologia molecular, o género *Saccharomyces* foi separado em três grupos, sendo que um deles, *Saccharomyces sensu stricto*, compreendia as espécies *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* e *S. paradoxus*, que não são diferenciáveis por testes fisiológicos (Fernández-Espinar *et al.*, 2000; Montrocher *et al.*, 1998; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). A espécie anteriormente conhecida como *S. cerevisiae* var. *uvarum* foi incluída em *S. bayanus*, passando a ser *S. bayanus* var. *uvarum* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Mais recentemente, autores como Nguyen e Gaillardin (2005) e Pulvirenti *et al.* (2000) provaram através de técnicas moleculares utilizando o DNA ribossomal que *S. uvarum* é uma espécie distinta dentro do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, e não um sinónimo ou variedade de *S. bayanus* ou *S. cerevisiae*.

A estirpe tipo de *S. uvarum* para este novo estatuto taxonómico é a CBS 395 (Nguyen e Gaillardin, 2005).

As principais leveduras de vinificação dentro do género *Saccharomyces* são *S. cerevisiae* e *S. uvarum* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). As características que fazem de *S. cerevisiae* a levedura de eleição para a fermentação alcoólica, entre elas a capacidade de fermentações rápidas e completas, foram já referidas neste trabalho (secção 2.2.1 e secção 2.2.2). A espécie *S. uvarum* é também encontrada muitas vezes em fermentações espontâneas, e está associada a temperaturas baixas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Sampaio e Gonçalves, 2008). É também conhecida por produzir mais 2-feniletanol do que *S. cerevisiae*, e por isso dar origem a vinhos com aroma floral (a rosas) mais acentuado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

2.2.6 Particularidades da vinificação em branco

Os processos aplicados na fermentação de mostos de uvas brancas não são os mesmos que se aplicam no caso de uvas tintas, o que faz com que os vinhos brancos tenham uma cor, sabor e carácter diferente, como é desejável. As principais diferenças, no caso da vinificação em branco, são a prensagem das uvas antes da etapa de fermentação e a ausência de maceração. Desta forma consegue-se que o vinho branco não incorpore as substâncias amargas de aroma herbáceo do engaço e da película (Peynaud, 1989).

No processo tradicional de vinificação em branco, depois da vindima e receção das uvas, procede-se à extração do mosto por meios mecânicos. As uvas são desengaçadas, esmagadas, e depois prensadas para libertar o mosto. Pode ser adicionado dióxido de enxofre (sulfitagem) para proteger o mosto antes da fermentação, e também bentonite para clarificar o mosto, eliminar materiais em suspensão e diminuir a turvação (Peynaud, 1989).

Além de uma fonte de carbono, as leveduras necessitam também de uma fonte de azoto para se desenvolverem. O mosto contém azoto sob várias formas: azoto amoniacal (nomeadamente o ião amónio, NH_4^+ , e o amoníaco, NH_3), aminoácidos, polipéptidos e proteínas. O azoto amoniacal é o que as leveduras assimilam mais facilmente, seguido dos aminoácidos, e deve estar presente em concentrações entre 25 mg/L e 50 mg/L. Quando o teor em azoto amoniacal do mosto é inferior a 25 mg/L, ou o teor de azoto assimilável é inferior a 100 mg/L, deve proceder-se à suplementação do mosto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A etapa seguinte é a fermentação alcoólica. O mosto é inoculado com levedura seca ativa e a temperatura deve ser controlada e mantida abaixo dos 20 °C (Peynaud, 1989). Temperaturas baixas podem ajudar numa maior produção de ésteres e menor perda de aromas varietais, o que contribui de forma positiva

para a complexidade do aroma do vinho final. Um aumento da clarificação do mosto também pode resultar numa maior produção de ésteres — com aromas frutados e florais (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Durante o início da fermentação o mosto deve ser arejado, para que as leveduras consigam sintetizar esteróis que são componentes essenciais para a permeabilidade da membrana celular. Durante a conversão dos açúcares em etanol, a massa volúmica do mosto diminui, e a fermentação dá-se por terminada (no caso dos vinhos secos) quando este parâmetro atinge um valor inferior a 1000 g/L. No final da fermentação alcoólica é feita uma trasfega para separar as borras que se depositam no fundo da cuba ou fermentador e procede-se novamente à sulfitação, corrigindo a concentração de dióxido de enxofre, para preservar o vinho (Peynaud, 1989; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

2.3 O aroma do vinho

A qualidade do vinho pode ser avaliada por uma mistura de análises sensoriais — cor, gosto e aroma — e químicas — diversidade e concentração de pigmentos, moléculas aromáticas, açúcares, ácidos, etc. (King *et al.*, 2010; Loira *et al.*, 2014). A primeira impressão que se tem de um vinho é dada pelo seu aspeto e, em especial, pela cor. O sentido da visão é determinante na avaliação primária da qualidade do vinho, do seu estado de evolução e da existência de defeitos (Genisheva *et al.*, 2012).

Do ponto de vista do consumidor, a característica mais importante dos vinhos é o seu sabor (Genisheva *et al.*, 2012; Lambrechts e Pretorius, 2000). O sabor de um vinho, ou de qualquer outro produto, pode ser visto como a impressão sensorial global causada tanto pelo seu gosto como pelo aroma (Lambrechts e Pretorius, 2000).

O gosto de um alimento está relacionado apenas com o que é percebido na boca pelas papilas gustativas, e pode ser doce, salgado, amargo, ácido, ou uma combinação destes. No caso do vinho, podem ser encontrados todos estes gostos elementares, provocados por diferentes moléculas que fazem parte da sua complexa constituição. A doçura, em maior ou menor grau, deriva do etanol, do glicerol e dos açúcares residuais que não foram fermentados; a acidez é causada pelos ácidos provenientes da uva ou formados durante a fermentação; sais minerais dissolvidos podem dar um gosto ligeiramente salgado; o amargor é proveniente de compostos fenólicos, como os taninos. Existem também outras sensações que são percebidas na boca, como a adstringência e o chamado “corpo” do vinho, que na realidade estão mais associadas ao sentido do tato (Peynaud, 1989).

Por sua vez, o aroma pode ser percebido por via nasal direta, quando moléculas voláteis atingem os recetores olfativos pelo nariz, ou por via retronasal, quando as moléculas se vaporizam na boca (devido

também à temperatura corporal) (Jacobson, 2006; Peynaud, 1989).

O gosto e o aroma do vinho são percepções sensoriais que variam não só com a composição química do produto, mas também com o indivíduo e a sua experiência. A resposta final do consumidor depende de muitas variáveis e é difícil de prever (Fleet, 2003).

O aroma é um componente muito importante da qualidade organolética dos vinhos (Mateos *et al.*, 2006). As várias espécies e estirpes de leveduras que se desenvolvem durante o processo fermentativo global metabolizam os constituintes do sumo de uva. A fermentação alcoólica é a via metabólica pela qual as leveduras convertem os açúcares do mosto em etanol, dióxido de carbono e outros subprodutos menos abundantes, enquanto produzem energia para as suas funções vitais (Andorrà *et al.*, 2012; Ciani *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2003). Os metabolitos secundários destas reações são uma vasta gama de compostos voláteis e não voláteis, que influenciam e determinam o aroma e gosto do vinho (Andorrà *et al.*, 2012; Romano *et al.*, 2003). O teor total de compostos voláteis do aroma no vinho varia entre 0.8 g/L e 1.2 g/L (Mateos *et al.*, 2006).

Em termos químicos, o aroma do vinho depende de vários fatores como a variedade, o estado sanitário e a maturação da uva, das práticas enológicas, dos microrganismos envolvidos e dos processos de maturação, se aplicados (Fleet, 2003; Hernández *et al.*, 2003; King *et al.*, 2010). Desta forma, os compostos que constituem o aroma do vinho podem ser classificados consoante a sua origem: compostos do aroma varietal são provenientes das uvas; o aroma pré-fermentativo está ligado aos compostos formados durante as operações de extração e condicionamento do mosto; aroma fermentativo corresponde aos compostos produzidos por leveduras e bactérias durante as fermentações; o aroma pós-fermentativo está relacionado com as reações que ocorrem durante os processos de conservação e/ou envelhecimento (Lambrechts e Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2003).

2.3.1 Aroma Varietal

Os compostos do aroma existentes nas próprias uvas refletem as principais características da casta, do clima e do solo, e são responsáveis pelo aroma varietal dos vinhos. Embora uma grande parte das castas seja praticamente inodora, os compostos voláteis do aroma originários das uvas revelam-se após a fermentação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Os terpenos são um dos principais componentes da uva que contribuem para o aroma do vinho, e estão

presentes em duas formas: sob a forma livre volátil, ou sob forma de precursores glicosilados não-voláteis e inodoros (Hernández *et al.*, 2003; Spagna *et al.*, 2002; Villena *et al.*, 2007). A razão de terpenos conjugados para livres pode ser tão alta como de 15:1 (Spagna *et al.*, 2002). A fórmula base dos terpenos é $(C_5H_8)_n$, e podem pertencer a diferentes grupos químicos: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e ácidos (Oliveira, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Os mais interessantes são os álcoois monoterpénicos (terpenóis), que apresentam aromas florais e frutados mesmo a baixas concentrações, como o linalol, geraniol, nerol, α -terpineol, citronelol e Ho-trienol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000) que constam da Tabela 1. Sendo capaz de hidrolisar a ligação entre terpeno e glicosídeo, a β -glucosidase contribui para um aumento da concentração destas substâncias aromáticas no vinho (Ciani *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2003; Villena *et al.*, 2007).

As metoxipirazinas são compostos heterocíclicos azotados voláteis, muito características de algumas castas, e que conferem um aroma vegetal (semelhante a pimento verde) e por vezes terroso. Alguns exemplos mais significativos são a 2-metoxi-3-isobutilpirazina, a 2-metoxi-3-isopropilpirazina e a 2-metoxi-3-*sec*-butilpirazina (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Os norisoprenóides em C_{13} , derivados dos carotenoides, existem na uva principalmente associados a açúcares e em menor quantidade no estado livre. No decorrer da fermentação são libertados dos precursores por hidrólise ácida ou enzimática, sofrendo depois alguns rearranjos químicos, e contribuindo para o aroma final do vinho. Um dos mais importantes é a β -damascenona, que tem um aroma complexo floral e frutado (rosa, mel, fruto tropical, compota de maçã) perceptível a baixas concentrações (Francis e Newton, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Os tióis voláteis, originados a partir dos *s*-conjugados de cisteína podem ter aromas interessantes, mas a concentrações mais elevadas o seu cheiro torna-se desagradável. Isto acontece, por exemplo, com a

Tabela 1 – Álcoois monoterpénicos e descritores aromáticos associados

Terpenol	Descritores^(a)
Linalol	Floral, lavanda
α -Terpineol	Pinho, lírio
Citronelol	Limão verde
Nerol	Lima, rosa
Ho-trienol	Tília
Geraniol	Rosa

(a) – Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Vilanova *et al.*, 2010.

4-mercapto-4-metil-2-pentanona, que pode apresentar tanto um aroma de buxo, giesta ou maracujá, como de “urina de gato”, dependendo da concentração (Francis e Newton, 2005; Oliveira, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

2.3.2 Aroma fermentativo

As leveduras fazem uma contribuição positiva para as características sensoriais do vinho durante a fermentação alcoólica através da utilização dos componentes do mosto, da produção de etanol e outros solventes que ajudam a extrair componentes das partes sólidas da uva, pela produção de centenas de metabolitos secundários aromáticos e pela produção de enzimas, que transformam compostos neutros da uva em compostos ativos do aroma. Estas reações, especialmente a produção de metabolitos secundários, variam com a espécie e estirpe de levedura (Fleet, 2003). Os compostos do aroma fermentativo são os mais abundantes e os principais responsáveis pelo caráter do vinho final (Oliveira, 2000).

O etanol, glicerol e dióxido de carbono são os principais compostos voláteis produzidos na fermentação, mas têm uma contribuição relativamente pequena para o aroma do vinho. Os compostos menos abundantes como ácidos orgânicos, álcoois superiores e seus ésteres, e o acetaldeído, formam o "bouquet" fermentativo e são os principais responsáveis pelo aroma do vinho (Andorrà *et al.*, 2012; Lambrechts e Pretorius, 2000; Romano *et al.*, 2003). Quando presentes em concentrações excessivas, alguns destes compostos podem tornar-se indesejáveis (Barrajón *et al.*, 2011; Mateos *et al.*, 2006; Romano *et al.*, 2003).

O ácido acético, o acetaldeído, o acetato de etilo, o 1-propanol, o 2-metil-1-propanol, o 2-metil-1-butanol e o 3-metil-1-butanol perfazem mais de metade dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma. A outra metade está distribuída entre 600 a 800 compostos presentes em quantidades muito baixas (acetais, ácidos orgânicos, álcoois, compostos fenólicos e compostos heterocíclicos, ésteres e compostos sulfurados) (Mateos *et al.*, 2006). O perfil aromático do vinho não é definido pelos compostos individuais, mas sim pela mistura dos mesmos (Villena *et al.*, 2007).

Os álcoois superiores são quantitativamente a maior família de compostos aromáticos no vinho. São hidrocarbonetos com uma função álcool e mais de dois átomos de carbono (peso molecular superior ao do etanol), e são caracterizados pelo seu cheiro forte e pungente, com exceção do 2-feniletanol que é associado a um aroma a rosas (Lambrechts e Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). A concentração de álcoois superiores no vinho pode variar entre 100 mg/L e 300 mg/L, e dentro destes

valores fazem uma contribuição positiva para o aroma do vinho; acima deste limite podem ter um impacto negativo (Lambrechts e Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Os álcoois superiores mais abundantes nos vinhos (que podem existir em concentrações superiores a 50 mg/L) são o 2-metil-1-propanol, o 3-metil-1-butanol, o 2-metil-1-butanol e o 2-feniletanol. Outros exemplos ainda são o 1-propanol, o 1-butanol e o 1-hexanol (Oliveira, 2000). Apesar de o cheiro forte a álcool ser uma característica bastante frequente dentro deste grupo, alguns compostos individuais apresentam odores agradáveis, como se pode observar nos exemplos da Tabela 2. O contributo da mistura, no entanto, pode ter um efeito mais positivo do que os compostos individuais para o carácter final do vinho.

As vias metabólicas da levedura pelas quais se formam os álcoois superiores estão muito dependentes dos aminoácidos e outras formas de azoto presentes do mosto, e a sua relação é complexa. A maior parte dos álcoois superiores é formado por via anabólica a partir dos açúcares; se o mosto for pobre em azoto facilmente assimilável, a levedura degrada os aminoácidos e formam-se os álcoois correspondentes (via catabólica). A presença de grandes quantidades de aminoácidos provoca a diminuição da formação de álcoois superiores por via anabólica (Lambrechts e Pretorius, 2000; Oliveira, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Por esta e outras razões é importante controlar o teor de azoto no mosto: uma deficiência de azoto pode prejudicar o crescimento das leveduras e conseqüentemente a fermentação, mas como são forçadas a degradar aminoácidos para obter azoto a formação de álcoois superiores é maior, podendo acentuar o seu carácter pesado; pelo contrário, um excesso de azoto amoniacal significa que a levedura não necessita de metabolizar aminoácidos, e por isso formam-se menos produtos secundários (álcoois superiores e seus ésteres). Chuva no final da maturação pode diluir o mosto, o que pode intensificar o odor a álcoois superiores do vinho — que só é interessante no caso dos que apresentam aromas agradáveis, como o 2-feniletanol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Tabela 2 – Álcoois superiores mais relevantes e descritores aromáticos associados

Álcoois superiores	Descritores^(a)
2-feniletanol	Rosas, adocicado, perfumado
2-metil-1-butanol	Álcool, banana, medicinal, solvente
3-metil-1-butanol	Álcool, banana, adocicado
1-hexanol	Coco, folhas verdes
2-metil-1-propanol	Álcool
1-propanol	Álcool

(a) – Oliveira, 2000; Francis e Newton, 2005.

Os ácidos gordos voláteis são também um dos grupos envolvidos no aroma do vinho. O ácido acético é o principal composto deste grupo, e embora possa provocar um odor desagradável a vinagre quando em excesso, o seu contributo é importante em concentrações entre os 200 mg/L e os 700 mg/L. Outros ácidos gordos voláteis são o ácido propanóico, o 2-metilpropanóico, o 2-metilbutírico e o 3-metilbutírico (Lambrechts e Pretorius, 2000; Oliveira, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), apresentados na Tabela 3.

Apesar dos odores negativos associados aos ácidos gordos, a sua concentração no vinho não costuma ser suficiente para ser perceptível, e acredita-se que são necessários para manter um bom equilíbrio do aroma do vinho (Oliveira, 2000).

Os ésteres são componentes muito importantes do aroma, principalmente nos vinhos jovens (podem sofrer hidrólise durante a maturação) (Lambrechts e Pretorius, 2000). Pode existir um grande número de ésteres nos vinhos, provenientes das reações de equilíbrio entre um ácido e um álcool, como no exemplo da Figura 1, e quase todos eles apresentam individualmente aromas frescos e agradáveis, florais ou frutados (Lambrechts e Pretorius, 2000; Oliveira, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Os ésteres podem ser de acetatos de álcoois superiores, ésteres etílicos de ácidos gordos ou ésteres etílicos de ácidos fixos. Estes últimos, dos quais é exemplo o succinato de dietilo, são relativamente insignificantes para o aroma do vinho. Alguns dos principais acetatos de álcoois superiores são o acetato de 3-metil-1-butilo, o acetato de hexilo e o de 2-feniletilo. Exemplos de ésteres etílicos de ácidos gordos são o butanoato de etilo, o hexanoato de etilo e o octanoato de etilo. O acetato de etilo é o principal éster nos vinhos, e é o único que pode ser considerado de aroma desagradável acima de um certo limite (aproximadamente 100 mg/L) (Lambrechts e Pretorius, 2000; Oliveira, 2000).

Tabela 3 – Ácidos gordos voláteis mais frequentes nos vinhos e descritores aromáticos associados

Ácidos gordos voláteis	Descritores^(a)
Ácido acético	Vinagre
Ácido 2-metilpropanóico (isobutírico)	Suor, amargo, avinagrado
Ácido butírico (butanóico)	Amanteigado, queijo, suor
Ácido 3-metilbutírico (isovalérico)	Queijo, suor
Ácido hexanóico (capróico)	Ácido gordo, óleo vegetal, suor
Ácido octanóico (caprílico)	Ácido gordo, óleo vegetal, queijo, suor
Ácido decanóico (cáprico)	Cera, sebo, ranço, sabão

(a) – Oliveira, 2000; Francis e Newton, 2005.

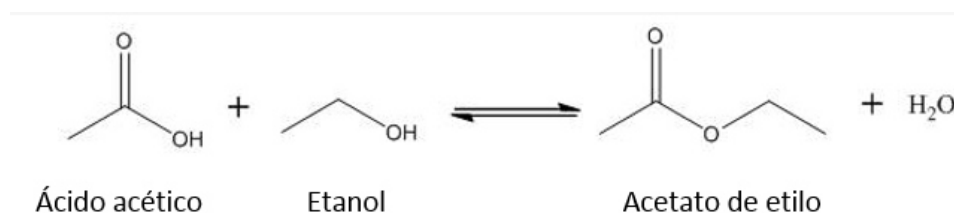


Figura 1 – Reação de formação de um éster (acetato de etilo) a partir de um ácido (acético) e um álcool (etanol).

Alguns dos principais ésteres encontrados nos vinhos são referidos na Tabela 4. O teor de azoto no mosto também parece influenciar a formação de ésteres, mas enquanto alguns aumentam com o teor de azoto (hexanoato de etilo, octanoato de etilo e decanoato de etilo, acetato de hexilo e de 3-metil-1-butilo), outros diminuem (acetato de 2-feniletilo) (Ough e Lee, 1981).

Os compostos sulfurados formados na fermentação incluem tióis, sulfuretos e tioésteres, e a maioria está associada a odores intensos e desagradáveis. Dividem-se em dois grupos: compostos sulfurados ligeiros (com ponto de ebulição inferior a 90 °C), que têm odores de “ovos podres” e “reduzido”, são negativos para a qualidade do vinho e incluem o sulfureto de hidrogénio, dióxido de enxofre e metanotiol; os compostos sulfurados superiores participam no aroma de forma mais complexa, incluem o metionol (3-metiltiopropanol, odor a “couve cozida”) e o dissulfureto de dimetilo (aroma a marmelo), entre outros (Lambrechts e Pretorius, 2000; Oliveira, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Os aldeídos pertencem ao grupo dos compostos carbonilados, e nos vinhos são perceptíveis mesmo a

Tabela 4 – Principais ésteres encontrados nos vinhos e descritores aromáticos associados

	Descritores^(a)
Acetatos de álcoois superiores	
Acetato de etilo	Solvente, ananás, frutado, adocicado
Acetato de hexilo	Adocicado, aromático, perfumado
Acetato de 2-feniletilo	Rosas, mel, maçã, adocicado
Acetato de 3-metil-1-butilo (de isoamilol)	Banana, maçã, solvente
Ésteres estílicos de ácidos gordos	
Butanoato de etilo (butirato etilo)	Papaia, manteiga, adocicado, maçã
Hexanoato de etilo	Maçã, frutado, adocicado, anis
Octanoato de etilo	Maçã, adocicado, frutado
Decanoato de etilo	Ácidos gordos, frutado, maçã, uva, solvente

(a) – Oliveira, 2000; Francis e Newton, 2005.

baixas concentrações. Podem apresentar aromas de maçã, citrinos ou frutos secos. Um dos principais compostos de carbonilo é o acetaldeído, que nos vinhos brancos funciona como um indicador do estado de oxidação devido ao seu aroma a maçã verde e a “oxidado” (Lambrechts e Pretorius, 2000; Oliveira, 2000). Normalmente está presente no final da fermentação em concentrações inferiores a 200 mg/L. Deste grupo fazem também parte o diacetilo e a acetoina (Oliveira, 2000).

Outros voláteis menos significativos são compostos azotados. Os mais abundantes no vinho são as acetamidas (de aminas primárias), como a N-(3-metilbutil)-acetamida. A sua concentração pode ultrapassar 1 mg/L mas não parecem ter influência sobre o aroma (Oliveira, 2000).

Finalmente, os compostos fenólicos, além de serem importantes para a cor do vinho, também podem ter impacto sobre o seu aroma. Os fenóis voláteis mais importantes produzidos durante a fermentação de vinhos brancos são o 4-vinilfenol (guache, farmácia) e o 4-vinilguaiacol (cravo-da-índia, especiarias) (Francis e Newton, 2005; Lambrechts e Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Quando a mistura dos dois atinge concentrações acima de 725 µg/L, começam a sentir-se odores desagradáveis, fenólicos e a “farmácia”, que podem contribuir para a depreciação do aroma dos vinhos brancos (Lambrechts e Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

2.3.3 Precursores de aroma

Para que as moléculas responsáveis pelo aroma consigam produzir uma sensação odorífera no provador, estas devem estar num estado volátil, livres de outras moléculas. As uvas contêm substâncias do aroma na forma livre e outras que estão ligadas, sendo neste caso inodoras. A maioria das castas de uvas é pouco aromática, ou seja, contém principalmente substâncias não voláteis que são precursoras de aromas, como glicosídeos, ácidos gordos, carotenoides ou compostos fenólicos (Oliveira, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Os precursores glicosilados são constituídos por uma parte de hidrato de carbono (uma ou duas moléculas de açúcar – estrutura glicona) ligada a uma aglicona aromática (Oliveira, 2000; Spagna *et al.*, 2002). A estrutura química aglicona (volátil quando livre) pode variar, tomando a forma de um terpenol (linalol, geraniol, nerol, citronelol, α -terpineol), óxido de linalol, álcool linear ou cíclico (hexanol, 2-feniletanol, álcool benzílico) norisoprenóide em C₁₃, ácido fenólico ou fenol volátil (Maicas e Mateo, 2005; Oliveira, 2000; Villena *et al.*, 2007). Os precursores glicosilados podem ser hidrolisados por via ácida ou enzimática, libertando a respetiva aglicona na forma volátil e odorífera (Maicas e Mateo, 2005; Oliveira, 2000).

A hidrólise enzimática de glicosídeos ocorre em duas etapas, esquematizadas na Figura 2: primeiramente atuam uma α -ramnosidase, uma α -arabinosidase ou uma β -apiosidase, fazendo a clivagem do açúcar terminal e libertando ramnose, arabinose ou apiose, e os β -D-glicosídeos correspondentes; em seguida, por ação da β -glucosidase, é libertada a aglicona volátil (Maicas e Mateo, 2005).

Uma das principais razões para a grande aposta na introdução de estirpes não-*Saccharomyces* em inóculos de arranque da fermentação alcoólica é a diversidade de enzimas que estas produzem e segregam, entre elas a β -glucosidase (Ciani *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010).

A atividade da β -glucosidase é frequentemente encontrada nas leveduras presentes na própria uva, nomeadamente dos géneros *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia* e *Brettanomyces*, e é rara em *S. cerevisiae* (Ciani *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2003; Spagna *et al.*, 2002). A β -glucosidase produzida pelas leveduras, ao contrário da que está presente na uva, não é inibida por glucose (Ciani *et al.*, 2010).

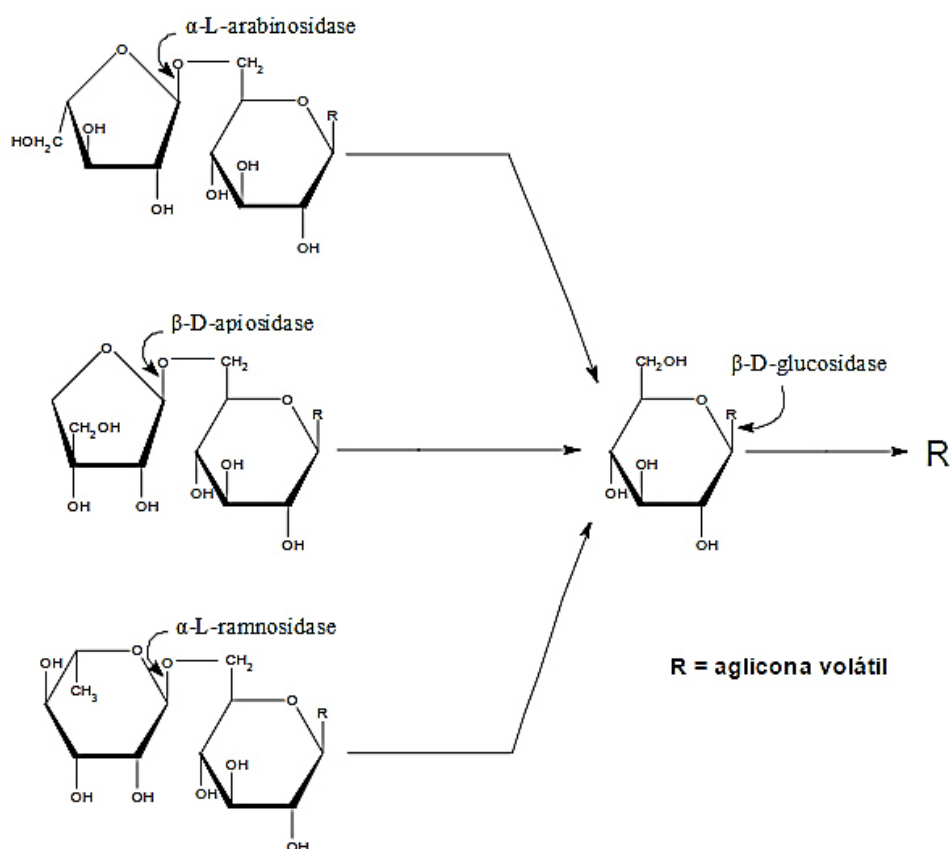


Figura 2 – Mecanismo de atuação das diferentes enzimas envolvidas na hidrólise dos precursores glicosilados (reproduzido com autorização de Oliveira, 2000).

A maioria dos ácidos gordos presentes nas uvas são insaturados, constituintes dos lípidos, e os principais são o ácido linoleico e linoléico (Oliveira, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Estes são precursores de aldeídos com 6 átomos de carbono, nomeadamente o hexanal, *Z*-3-hexenal e *E*-2-hexenal, que são caracterizados por aromas herbáceos; por sua vez, estes aldeídos são precursores dos álcoois correspondentes. A transformação dos lípidos em substâncias voláteis do aroma é o resultado da ação de várias enzimas, que entram em contacto com o substrato durante os tratamentos mecânicos aplicados à vindima (Oliveira, 2000). Por esta razão, os álcoois e aldeídos em C₆ são característicos do aroma pré-fermentativo, mas estão relacionados com a variedade de uva.

Os carotenoides presentes nas uvas (como a luteína e o β -caroteno) podem ser transformados por ação da luz ou de oxidases em fragmentos mais pequenos e voláteis, contendo entre 9 e 13 átomos de carbono. Os compostos resultantes de maior interesse são os norisoprenóides em C₁₃ (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Os ácidos cafeico, *p*-cumárico e ferúlico são os ácidos fenólicos mais relevantes nas uvas. Através de diferentes reações podem dar origem a outros compostos, nomeadamente os fenóis voláteis. Outros precursores presentes nas uvas são os S-conjugados de cisteína, que dão origem a tióis voláteis. Monoterpenos e polióis terpénicos são também precursores de aromas (Oliveira, 2000).

2.4 Fundamentos das técnicas utilizadas

2.4.1 O equipamento OenoFoss™

O OenoFoss™ (Figura 3) é um equipamento analítico compacto, desenhado para as adegas que necessitam de medir diversos parâmetros do mosto ou do vinho e obter resultados em tempo real para tomar decisões. A sua utilização é simples, rápida, e bastam algumas gotas da amostra a analisar.

Este equipamento utiliza a tecnologia FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), isto é, espectroscopia de absorção infravermelha com transformada de Fourier, particularmente útil para amostras líquidas e homogéneas como é o caso do vinho ou mosto clarificado.

É feito passar um feixe de radiação infravermelha pela amostra colocada no aparelho; a amostra absorve parte dessa radiação consoante os seus constituintes e a concentração de cada um deles; o espectro de absorção resultante é então tratado matematicamente pelo modelo da transformada de Fourier, e em dois minutos são determinadas as concentrações de vários componentes da mistura, com relativa precisão.



Figura 3 — Equipamento OenoFoss™ (reproduzido de: <http://www.foss.dk/industry-solution/products/oenofoss/>).

Este equipamento tem que ser devidamente calibrado com soluções padrão. O OenoFoss™ tem vários módulos de trabalho: mosto, mosto em fermentação e vinho, cada um com os parâmetros principais para cada tipo de amostra. Podem ainda ser criados novos módulos, para amostras que se desviem das calibrações base, como acontece para o Vinho Verde, cuja acidez pode ser bastante elevada e por isso pode ser feito um novo módulo com calibrações mais adequadas. Este equipamento permite medir os seguintes parâmetros e concentrações:

- Mosto: Sólidos Solúveis totais (*SS7*), pH, Acidez Total (*AT*), Acidez Volátil (*AV*), *Alpha Amino Nitrogen* (*AAV*), Azoto amoniacal, Ácido tartárico, Ácido málico, Ácido glucónico e Massa volúmica (ρ);
- Mosto em fermentação: Etanol, Acidez Total, Acidez Volátil, Ácido málico, Glucose+Frutose e pH;
- Vinho: Etanol, Acidez Total, Acidez Volátil, Ácido málico, Ácido láctico, Glucose+Frutose, Glucose, Frutose, Massa volúmica e pH.

Este equipamento pode ainda ser complementado com um segundo módulo somente para determinação da cor.

2.4.2 Técnicas moleculares

O PCR (*Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase) é uma técnica molecular muito utilizada para identificar e distinguir leveduras, porque permite amplificar regiões específicas do DNA, com maior ou menor grau de conservação. O genoma das leveduras, em particular os genes que codificam o RNA ribossomal (genes 5S, 5.8S, 18S e 26S do rDNA), representados na Figura 4, são encontrados em conjuntos repetidos entre 100 e 200 vezes. Estes genes contêm sequências que se

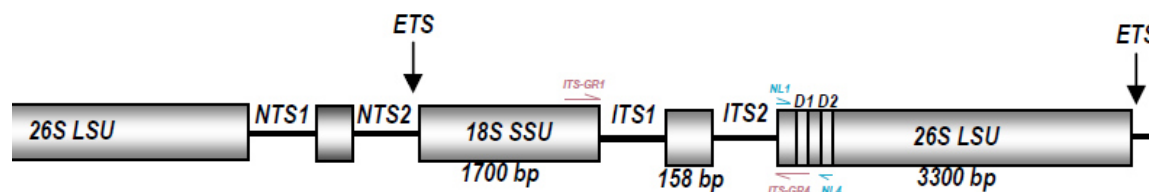


Figura 4 – Esquema da organização dos genes de rDNA (SSU – *Small Subunit*, LSU – *Large Subunit*); a vermelho: zona de ligação dos *primers* ITS1 e ITS4 para amplificação das regiões ITS e do gene 5.8S; a azul: zona de ligação dos *primers* NL1 e NL4 para amplificação da região D1/D2 do gene 26S (reproduzido de Schuller, 2009).

mantêm praticamente intactas em todos os organismos do mesmo género ou espécie, e outras que são polimórficas e permitem distinguir entre estirpes da mesma espécie. O PCR pode também ser utilizado em conjunto com outras técnicas, como digestão dos fragmentos de DNA resultantes com enzimas de restrição (endonucleases), o que lhe confere um poder discriminatório ainda maior (Pham *et al.*, 2011). Todas as técnicas dependentes de PCR envolvem a extração de DNA de células de uma cultura pura (OIV, 2011).

Para identificar leveduras *S. cerevisiae* é usual utilizar-se a amplificação das regiões δ (delta). O genoma de *S. cerevisiae* contém retrotransposições Ty1, que ocorrem em grande número de cópias. As sequências delta são elementos de DNA com 334 pares de bases (a partir deste ponto abreviado para pb) que flanqueiam os retrotransposições Ty1, e podem encontrar-se repetidas no genoma de *S. cerevisiae* até 100 vezes. O seu número e localização apresenta uma certa variabilidade intraespecífica, permitindo portanto distinguir entre estirpes da mesma espécie (OIV, 2011; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Schuller *et al.*, 2004). Uma vez que os elementos Ty1 podem mudar de posição no genoma, as sequências delta podem ter várias localizações, junto destes ou não. O método de PCR interdelta consiste então na amplificação das regiões que ocorrem entre os elementos delta repetidos, cuja distância não excede 1000 pb. Após eletroforese dos produtos de PCR é possível verificar que as regiões interdelta, isto é, a distância entre um elemento delta e o seguinte, forma um padrão identificativo. Outras espécies do género *Saccharomyces* possuem menos elementos Ty1 no genoma, e consequentemente menos sequências delta, pelo que não podem ser distinguidas por esta técnica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Quando se pretende identificar ou comparar outras espécies, é necessária a aplicação de outras técnicas.

Os genes de rDNA das leveduras contêm sequências não-codificantes, nomeadamente as sequências ITS (*Internal Transcribed Spacer* – espaçador interno transcrito), regiões variáveis que se encontram em ambas as extremidades do gene 5.8S (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Fernández-Espinar *et al.*, 2000;

Montrocher *et al.*, 1998; Pham *et al.*, 2011). A região 5.8S-ITS exhibe baixo polimorfismo intraespecífico e elevada variabilidade interespecífica, ou seja, varia consoante a espécie mas mantém-se constante em organismos da mesma espécie, o que permite a distinção entre espécies diferentes (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Fernández-Espinar *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2011). Embora as sequências sejam diferentes, quando amplificadas, os produtos do PCR-ITS de leveduras do mesmo género podem ter um comprimento muito semelhante (OIV, 2011). Espécies do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, por exemplo, têm um fragmento amplificado das regiões ITS e do gene 5.8S com tamanho entre 840 pb e 880 pb (Pham *et al.*, 2011), uma diferença difícil de perceber no gel de eletroforese.

Para distinguir entre espécies estreitamente relacionadas, a amplificação das sequências ITS e do gene 5.8S é complementada com uma análise de restrição usando diferentes enzimas (por exemplo *HaeIII* e *HinfI*) (OIV, 2011; Pham *et al.*, 2011). A técnica de rDNA PCR-RFLP cria um padrão de restrição mais específico do que a simples amplificação das sequências polimórficas (OIV, 2011). No entanto, esta técnica não permite distinguir todas as espécies do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, mas apenas produzir uma lista mais reduzida de possíveis candidatos. A endonuclease *HaeIII* gera dois padrões de restrição diferentes entre as espécies do complexo *Saccharomyces sensu stricto* (Pham *et al.*, 2011).

Finalmente, um método ainda mais específico é a amplificação da região D1/D2 do gene 26S RNA e sequenciação do fragmento daí resultante. Esta sequência difere mais de 1 % entre espécies, e menos de 1 % entre estirpes da mesma espécie, e permite a identificação filogenética e classificação de isolados desconhecidos por comparação com as bases de dados existentes (OIV, 2011).

2.4.3 A prova organolética

No vinho estão presentes inúmeras substâncias voláteis, das quais apenas um subconjunto é perceptível sensorialmente (Molina *et al.*, 2009; Vilanova *et al.*, 2010). Os compostos voláteis que conferem ao vinho o seu aroma são moléculas pequenas, de peso molecular entre os 30 g/mol e 300 g/mol. A sensação olfativa que produzem não depende só da sua concentração no vinho, mas também da sua volatilidade e pressão de vapor (só são sentidos os que atingem as vias nasais). A complexidade da mistura onde se encontram também influencia a forma como os diferentes compostos do aroma são percebidos (Oliveira, 2000). Por estas razões, compostos em elevadas concentrações podem ser imperceptíveis enquanto, por outro lado, compostos presentes em poucos nanogramas por litro podem fazer contribuições muito significativas para o aroma global do vinho (Molina *et al.*, 2009; Oliveira, 2000).

Para tentar descrever o contributo que cada componente individual tem sobre a sensação global percebida pelo consumidor, utiliza-se o limiar de percepção olfativa (*LPO*) de cada composto, definido como a menor concentração capaz de produzir uma sensação olfativa em pelo menos 50 % dos provadores de um júri treinado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Compostos com elevado *LPO* só serão sentidos pela maioria dos provadores a concentrações elevadas, e vice-versa. Esta medida é uma forma de relacionar a concentração de um composto com o estímulo sensorial que provoca.

A abordagem mais comumente adotada para a quantificação das substâncias voláteis do aroma é a cromatografia gasosa associada a um detetor de ionização de chama (GC-FID) ou à espectrometria de massa (GC-MS) (Vilanova *et al.*, 2010). Mas determinar por meios analíticos a concentração de cada um dos compostos voláteis no vinho e ligá-los aos descritores que lhes são associados não é suficiente para compreender o resultado aromático final, sentido pelo consumidor. De facto, um vinho pode cumprir todos os parâmetros analíticos esperados e mesmo assim não ser agradável. É necessário complementar as técnicas de cromatografia gasosa com uma prova organolética, relacionando os dados instrumentais com os sensoriais (Genisheva *et al.*, 2012; Vilanova *et al.*, 2010).

Uma ferramenta utilizada para fazer a descrição completa de um produto é a análise descritiva quantitativa. Um painel de provadores treinados faz a análise sensorial do produto, mencionando todos os descritores dos aromas que deteta e a sua intensidade; depois o número de descritores é reduzido até se terem os mais significativos para o produto em questão (Vilanova *et al.*, 2010). Para os vinhos brancos e tintos existe um conjunto de descritores que são normalmente utilizados, por serem os mais característicos deste produto típico. Além do aroma são também avaliados o gosto e a cor dos vinhos provados e, por fim, é dada uma nota final tendo em conta todas as características anteriores. Os dados analíticos obtidos são depois comparados com a descrição feita pelo painel de provadores, tendo-se assim uma melhor compreensão do perfil organolético global do produto e do contributo de cada um dos compostos analisados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental consistiu na realização e avaliação de fermentações sequenciais à escala piloto (em cubas de 20 L), com duas leveduras com propriedades fermentativas distintas, designadas por Y2 e Y59. Estas leveduras fazem parte da atual coleção de leveduras da YeastWine, tendo sido previamente testadas em ensaios de fermentação e caracterizadas (Vieira *et al.*, 2010). A levedura Y59 é uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* tolerante a concentrações elevadas de etanol; a levedura Y2 tem elevada atividade da enzima β -glucosidase (que participa na libertação de compostos aromáticos do mosto) mas é mais sensível ao etanol, e foi caracterizada como pertencendo à espécie *Saccharomyces uvarum*.

Realizou-se um total de sete ensaios diferentes. Foram feitas fermentações de controlo com cada uma das leveduras puras e com ambas as leveduras em simultâneo. Os ensaios de fermentações sequenciais foram realizados por inoculação do mosto no momento inicial com a levedura Y2, e mais tarde com a levedura Y59, introduzida a diferentes valores de massa volúmica do mosto em fermentação. Retiraram-se amostras de biomassa durante as fermentações, das quais se isolaram colónias puras para determinar a percentagem de implementação de cada uma das leveduras em dois momentos da fermentação (meio e fim, aproximadamente). As fermentações foram monitorizadas diariamente; o mosto inicial, o mosto em fermentação e os vinhos finais foram analisados quimicamente. Os vinhos finais foram analisados em termos de compostos voláteis do aroma e passaram ainda por uma análise sensorial, sendo avaliados por um painel de provadores.

A descrição detalhada das etapas do trabalho é feita neste capítulo.

3.1 Preparação do meio e dos inóculos de levedura

Inicialmente todo o material de vidro necessário foi esterilizado numa estufa a 180 °C durante 2 h. Foi preparado meio líquido YEPD em frascos *Schott* de 1 L (20 g/L de D-glucose; 10 g/L de peptona bacteriana; 10 g/L de extrato de levedura; volume completado com água destilada). Todo o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min, e depois deixado a arrefecer.

Os pré-inóculos foram preparados numa câmara de fluxo laminar horizontal. Para cada estirpe, com a ponta de um palito estéril colocou-se uma pequena quantidade do *pellet* de levedura em *stock* (conservada a -80 °C numa solução de glicerol a 300 mL/L) em 50 mL de meio de cultura, num matraz de 100 mL. Os dois pré-inóculos, Y2 e Y59, foram deixados a crescer na incubadora por 48 h, a 30 °C

e agitação de 150 min^{-1} . Foi estimado que para cada ensaio (cuba de 20 L) seria necessário um volume de 200 mL de inóculo na primeira fase. Os volumes necessários de inóculo de cada levedura para os diferentes ensaios foram preparados em matrizes maiores, devidamente assinalados com o nome da estirpe, na câmara de fluxo laminar, em meio YEPD com 1 % dos pré-inóculos correspondentes.

Os inóculos foram deixados na incubadora a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação por 48 h, tendo o cuidado de não encher completamente os matrizes para não molhar a tampa de algodão.

3.2 Preparação e inoculação do mosto

Nos ensaios foi utilizado mosto de uvas brancas, previamente dessulfitado. Aquando da receção do mosto mediu-se a temperatura, a massa volúmica (por areometria segundo o método OIV-MA-AS2-01B:R2009) e determinou-se o álcool provável (*AP*). Retirou-se uma alíquota do mosto para análise posterior (que foi mantida no congelador). O mosto foi dividido pelas cubas de 20 L (previamente higienizadas) e a temperatura das camisas de arrefecimento foi ajustada para $16 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fez-se a leitura da densidade ótica (*DO*) a 620 nm dos inóculos que tinham sido preparados e calculou-se o volume que seria necessário adicionar para que cada cuba ficasse com uma concentração de células de aproximadamente 10^6 mL^{-1} . As inoculações foram feitas de acordo com o esquema da Figura 5.

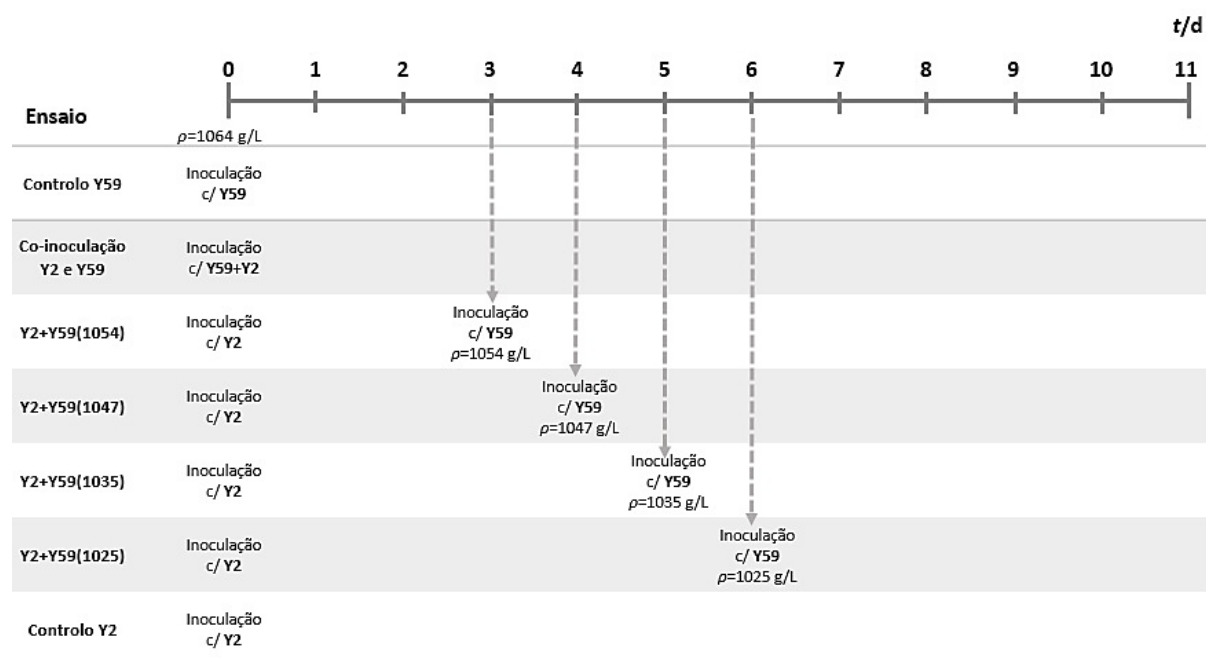


Figura 5 – Representação esquemática dos ensaios realizados, com as etapas de inoculação das leveduras Y2 e Y59 nas fermentações sequenciais (*t* – tempo).

A primeira cuba foi inoculada apenas com a levedura Y59 (Controlo Y59); a seguinte, correspondente ao ensaio de Co-inoculação, com metade de cada estirpe para perfazer a taxa de inoculação recomendada; as restantes cubas foram inoculadas inicialmente com a levedura Y2 e depois, a diferentes valores de massa volúmica do mosto em fermentação, com a levedura Y59. A última cuba foi deixada a fermentar apenas com a levedura Y2 como controlo (Controlo Y2).

Foi mantido um inóculo da levedura Y59 pronto a utilizar quando necessário (assim que a massa volúmica das cubas atingisse um dos patamares estipulados para a inoculação sequencial). De cada vez que se fez a segunda inoculação leu-se a *DO* do inóculo e calculou-se o volume necessário para ter uma concentração celular de 10^6 mL^{-1} (a mesma utilizada anteriormente).

3.3 Monitorização da fermentação

No decorrer das fermentações foram lidas diariamente a temperatura e massa volúmica em cada cuba. Foram também retiradas amostras de cada cuba para 2 tubos *ependorf* e congeladas, para as análises químicas do mosto em fermentação. Em cada cuba fez-se a remontagem diária do mosto durante cerca de 5 min para haver arejamento, até a massa volúmica ser inferior a 1040 g/L. As cubas mantiveram-se abertas até ao final das fermentações.

Para as análises microbiológicas foram retiradas duas amostras de cada cuba, a meio e próximo do fim da fermentação. Como as inoculações ocorreram em momentos diferentes e as fermentações não procederam ao mesmo ritmo, estas amostras não foram todas retiradas ao mesmo tempo (Figura 6). Ao retirar as amostras para as análises microbiológicas procedeu-se da seguinte forma: com uma micropipeta e pontas estéreis retiraram-se amostras de 1 mL de mosto em fermentação para tubos *ependorf*, centrifugou-se a $13\,000 \text{ min}^{-1}$ durante 2 min; em seguida, na câmara de fluxo, verteu-se o sobrenadante, ressuspenderam-se as células em 500 μL de uma solução de glicerol a 300 mL/L, agitou-se no vórtex e colocou-se no congelador a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

À medida que o mosto em fermentação em cada cuba foi atingindo uma massa volúmica de 1000 g/L, ou estabilizando perto deste valor, as fermentações foram sendo dadas como terminadas. Não se deixou a massa volúmica descer mais porque o mosto estava dessulfitado e, com o declínio da população de leveduras, tornava-se mais sensível ao desenvolvimento de bactérias lácticas ou acéticas. Em cada cuba com a fermentação terminada diminuiu-se a temperatura da camisa de arrefecimento para $5 \text{ }^\circ\text{C}$ e adicionou-se 4.8 g de metabissulfito de potássio. Fecharam-se as cubas e isolaram-se as saídas com *parafilm*.

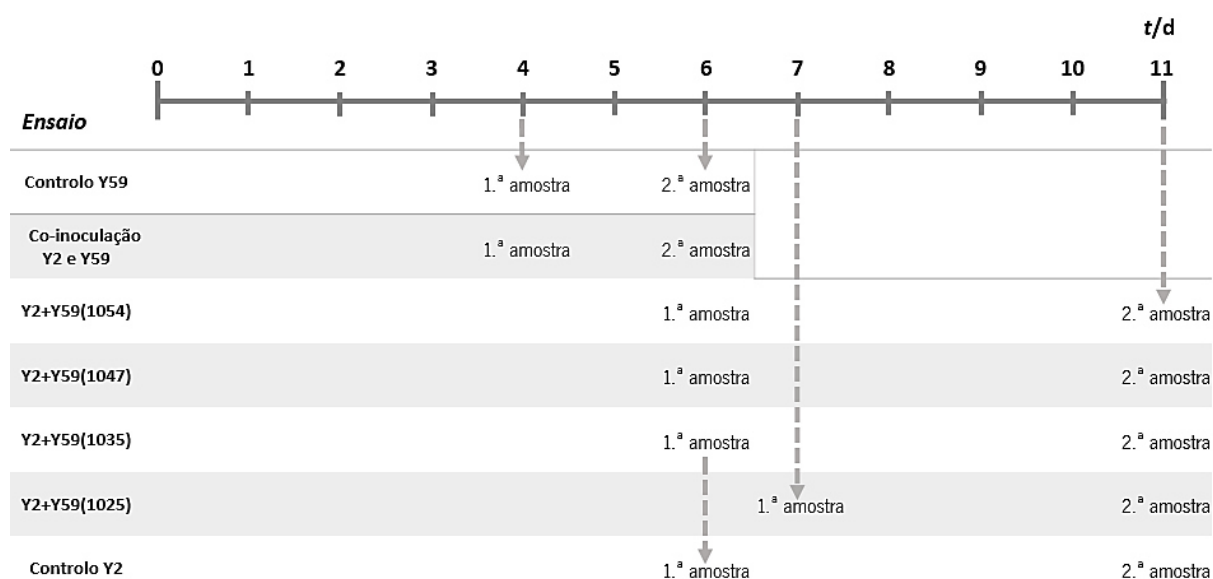


Figura 6 – Representação esquemática dos momentos em que foram retiradas amostras com biomassa do mosto em fermentação, nos diferentes ensaios (t – tempo).

Os vinhos dos ensaios Controlo Y59 e Co-inoculação permaneceram nas cubas fechadas durante 15 d, e os restantes durante 10 d (uma vez que as fermentações foram dadas como terminadas em momentos diferentes), para que as borras sedimentassem e a turvação diminuisse. Quando as cubas foram abertas, encheu-se uma garrafa de vidro, de 1 L, por cuba. Todos os vinhos foram conservados no frigorífico até ao dia da prova organolética. No dia da prova retiraram-se amostras de 50 mL de cada garrafa para tubos *Falcon*, para posterior análise química e dos compostos voláteis do aroma.

3.4 Análises físico-químicas

O mosto inicial, as amostras retiradas do mosto em fermentação e os vinhos produzidos foram analisados por diferentes meios, para determinação dos parâmetros físico-químicos mais relevantes para o trabalho em questão.

3.4.1 Massa volúmica e álcool provável

A massa volúmica aparente (ρ) do mosto inicial e do mosto em fermentação foi determinada por areometria de acordo com o método OIV-MA-AS2-01B:R2009. Em paralelo mediu-se também a temperatura do mosto. Com estes valores e com o título alcoométrico do mosto em fermentação em cada momento, fez-se a correção da massa volúmica aparente para 20 °C ($\rho_{20^{\circ}\text{C}}$), utilizando as tabelas que constam do método referido.

O álcool provável (*AP*) foi lido diretamente com um densímetro, antes do início das fermentações.

3.4.2 Análises ao mosto inicial, mosto em fermentação e vinhos com o OenoFoss™

As amostras de mosto em fermentação retiradas ao longo do tempo em cada cuba foram descongeladas e centrifugadas a $13\,000\text{ min}^{-1}$ durante 2 min. As análises foram feitas em triplicado com o equipamento OenoFoss™, e foi lido o título alcoométrico volúmico (*TAI*) e a concentração de glucose e frutose ($C_{\text{Glu+Fru}}$), no módulo de “Mosto em fermentação”.

O mosto inicial foi analisado da mesma forma, em triplicado, mas não foi necessário centrifugar. Os parâmetros lidos foram: sólidos solúveis totais (*SST*), pH, acidez total expressa em ácido tartárico (*AT*), *Alpha Amino Nitrogen* (*AAM*), massa volúmica a 20 °C, concentração de azoto amoniacal ($C_{\text{NH}_4^+}$), concentração de ácido tartárico ($C_{\text{Ac.Tartárico}}$) e de ácido málico ($C_{\text{Ac.Málico}}$).

Os vinhos finais foram também analisados no OenoFoss™ (sem centrifugação) para os parâmetros: título alcoométrico volúmico (*TAI*), acidez volátil expressa em ácido acético (*AV*), *AT*, pH e concentração de ácido láctico.

3.4.3 Doseamento de açúcares e glicerol nos vinhos por HPLC

Adicionalmente, para complementar as análises do OenoFoss™, fez-se a quantificação por HPLC do glicerol, glucose e frutose. A análise dos açúcares e glicerol por HPLC foi efetuada numa coluna *organic acids Chrompack* (300 mm x 6.5 mm), utilizando H_2SO_4 a 5 mmol/L como eluente, a um caudal de 0.30 mL/min; a temperatura do forno foi de 80 °C. A deteção destes constituintes foi feita por refratometria. Utilizou-se um *loop* de 20 μL para a injeção da amostra.

Para as curvas de calibração foi preparada uma solução com 9 g/L de glicerol, 15 g/L de glucose e 15 g/L de frutose, da qual se fizeram e injetaram 5 diluições. Com os valores de área do pico do cromatograma correspondente a cada composto, construíram-se as curvas de calibração área do pico *versus* concentração para cada composto (Anexo I). As amostras dos vinhos foram filtradas num *acrodisc* de 0.2 μm de porosidade, diluídas 50 % e, em seguida, injetadas em triplicado.

3.5 Análises microbiológicas

Inicialmente preparou-se meio de cultura YEPD sólido (20 g/L de D-glucose, 10 g/L de peptona bacteriana e 10 g/L de extrato de levedura em água destilada; depois de homogeneizar a mistura adicionou-se 20 g/L de agar). Esterilizou-se o meio a 121 °C durante 15 min.

Depois de esterilizado, o meio foi guardado numa estufa a 60 °C, para que não solidificasse enquanto se preparavam as placas de Petri. Ligou-se a câmara de fluxo e esperou-se aproximadamente 20 min. Na câmara de fluxo verteu-se o meio para placas de Petri, e depois de desaparecer a condensação guardaram-se no frigorífico. Descongelaram-se as amostras retiradas durante a fermentação. Adicionaram-se 0.5 mL de água estéril a cada amostra para perfazer o volume e concentração inicial.

3.5.1 Isolamento e repicagem

Em tubos *ependorf* estéreis colocaram-se 0.9 mL de água estéril para fazer as diluições. Começou-se por colocar 100 µL de amostra no primeiro *ependorf* (o de menor diluição), e agitou-se no vórtex; deste retiraram-se 100 µL para o *ependorf* seguinte, e assim sucessivamente, até se terem diluições de 10 vezes, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ e 10⁶. Marcaram-se todos os tubos e as placas respetivas com o mesmo código. As diluições 10⁴, 10⁵ e 10⁶ de cada amostra foram espalhadas nas placas anteriormente preparadas com meio sólido. As placas permaneceram na estufa a 30 °C por cerca de 48 h, até se conseguirem visualizar colónias bem definidas.

Das três diluições de cada amostra selecionou-se apenas uma, da qual foram escolhidos 20 isolados (colónias bem definidas e separadas). Os isolados foram colocados em novas placas, devidamente identificadas e divididas em 20 secções, fazendo o espalhamento de cada um com um palito estéril, na câmara de fluxo. Estas placas ficaram na estufa a 30 °C durante 48 h.

A biomassa das colónias crescidas foi então recolhida das placas de agar para microplacas de 96 poços, previamente esterilizadas com luz UV, contendo cada poço 150 µL de uma solução de glicerol a 300 mL/L. A biomassa de cada colónia foi retirada da placa de agar com um palito estéril e mergulhada num poço com a solução de glicerol, mexendo ligeiramente para suspender as células (na câmara de fluxo laminar). Destas microplacas retirou-se 30 µL de cada poço para microplacas novas, também estéreis (luz UV), para proceder à extração de DNA. As primeiras foram guardadas a -80 °C (por prevenção).

3.5.2 Extração do DNA

A extração do DNA das células dos isolados foi feita de acordo com o protocolo descrito por Drumonde-Neves *et al.* (2013). Para a lise celular, começou-se por adicionar a cada poço 100 µL de água estéril, centrifugaram-se as microplacas durante 2 min a 4000 min⁻¹ e em seguida rejeitou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* de cada poço em 10 µL de uma solução sorbitol (1 mol/L), EDTA-Na₂ (0.1 mol/L) e 0.8 µL liticase (Sigma, 3 U/µL), pH 7.5. A liticase só foi adicionada à solução

imediatamente antes de ser utilizada. Agitaram-se as microplacas no vórtex e incubaram-se a 37 °C por 30 min.

Adicionou-se a cada poço 10 µL de uma solução de Tris-HCl (50 mmol/L), EDTA-Na₂ (20 mmol/L) e SDS a 0.35 mol/L, pH 7.4. Incubaram-se as microplacas fechadas a 65 °C durante 5 min.

Para fazer precipitar os ácidos nucleicos adicionou-se 8 µL de acetato de potássio (5 mol/L) a cada poço, agitou-se e incubou-se a -20 °C durante 5 min. Centrifugaram-se as microplacas a 4 °C durante 15 min a 4000 min⁻¹. Em seguida o sobrenadante foi transferido para novas microplacas contendo 25 µL de isopropanol por poço, que foram incubadas à temperatura ambiente durante 5 min. Depois foram centrifugadas durante 2 min a 4000 min⁻¹, removeu-se o sobrenadante e lavaram-se os *pellets* com 50 µL de etanol a 70 %, voltando a centrifugar nas mesmas condições e a rejeitar o sobrenadante. Retiraram-se as tampas das microplacas e deixou-se ao ar até secar. Finalmente ressuspenderam-se os *pellets* em 50 µL de tampão TE 1:10 (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 7.5).

Em paralelo fez-se também a extração de DNA de cada uma das leveduras usadas para inocular o mosto, para comparação com os resultados das amostras. Utilizou-se um volume de 200 µL de suspensão celular do *stock* de cada levedura, Y2 e Y59, em dois tubos *ependorf*, e utilizaram-se os reagentes nas mesmas proporções.

3.5.3 PCR interdelta

Esta técnica foi realizada com base no protocolo descrito por Schuller *et al.* (2004). As reações de amplificação foram realizadas num termociclador Veriti de 96 poços (*Applied Biosystems*), utilizando os *primers* δ12 (5' – TCAACAATGGAATCCCAAC – 3') e δ2 (5' – GTGGATTTTATTCCAAC – 3'). O DNA dos isolados foi transferido das microplacas para placas de PCR, onde foi também colocado o DNA extraído das leveduras Y2 e Y59 em *stock*, para controlo e comparação dos perfis de bandas. Em cada poço das placas de PCR adicionaram-se 15 µL de mistura reacional, sendo 3 µL de amostra de DNA e 12 µL de uma solução pré-preparada: água ultrapura, 0.5 U de *Taq* polimerase, tampão *Taq* (10 mmol/L de Tris-HCl, 50 mmol/L de KCl), 25 pmol de cada *primer*, 0.4 mmol/L de cada dNTP e 3 mmol/L de MgCl₂. O programa para esta reação no termociclador foi definido com as seguintes etapas:

- Desnaturação inicial a 95 °C, 2 min;
- 35 ciclos: desnaturação a 95 °C, 30 s; emparelhamento a 43 °C, 1 min; extensão a 72 °C, 1 min;
- Extensão final a 72 °C, 10 min.

Os produtos amplificados foram diluídos na placa de PCR com 40 µL de água; daqui retiraram-se 2 µL para uma nova placa e adicionaram-se 15 µL de *loading buffer* em cada poço. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 15 g/L contendo *GelRed* como corante. Carregou-se os poços do gel de agarose com 8 µL dos pPCR em *loading buffer*, e os poços das extremidades com marcador de pesos moleculares (*GRS ladder* 50 pb, diluído em *loading buffer*). Nesta etapa teve-se o cuidado de colocar em cada gel um controlo da levedura Y2 e outro de Y59, para que fosse possível identificar as duas leveduras em cada gel independentemente das condições da eletroforese. A eletroforese de cada conjunto de amostras correu durante aproximadamente 60 min, a 180 V. O gel foi depois visualizado num transiluminador com luz UV e fotografado. Foram identificados os diferentes perfis de bandas em cada gel e comparados com os controlos das leveduras Y2 e Y59. Com este método não foi possível identificar todos os isolados.

As amostras de DNA dos isolados com os perfis mais característicos e algumas que deixaram dúvidas quanto à sua identidade foram compiladas numa nova placa. Com essas amostras de DNA repetiu-se o PCR interdelta e fez-se também PCR-RFLP das regiões ITS e do gene 5.8S. Após se confirmar a identidade de cada um dos isolados que foram recolhidos das placas de agar, relativos ao meio e fim da fermentação de cada uma das cubas, foi possível calcular uma percentagem da presença de cada levedura nos dois momentos (número de isolados de cada espécie em 20 isolados recolhidos, para cada amostra).

3.5.4 PCR-RFLP das regiões ITS e do gene 5.8S

Esta técnica foi realizada com base no protocolo descrito por Schuller (2009). Os *primers* usados foram ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'). Foi preparada uma mistura reacional com (volumes por poço): 19.2 µL água ultrapura, 3 µL tampão *Taq* 10x, 1.8 µL MgCl₂ (25 mmol/L), 0.6 µL de mistura de dNTP's (10 mmol/L), 1.2 µL de cada *primer* (10 pmol/µL) e 0.1 µL de *Taq* polimerase (5 U/µL). Desta mistura foram utilizados 27 µL por poço, mais 3 µL de amostra de DNA. As condições do termociclador para a reação foram as seguintes:

- Desnaturação inicial a 95 °C, 6 min;
- 35 ciclos: desnaturação a 95 °C, 20 s; emparelhamento a 53 °C, 20 s; extensão a 72 °C, 1 min;
- Extensão final a 72 °C, 5 min.

Antes de fazer a restrição nos produtos de PCR na placa testaram-se duas enzimas, *Hae*III e *Hinf*I, em amostras de DNA amplificado diretamente das leveduras Y2 e Y59 em *stock*. Destas duas, apenas com

*Hae*III houve diferenciação dos perfis das leveduras. Desta forma, aos produtos de PCR adicionou-se uma solução com a enzima de restrição *Hae* III e incubou-se a 37 °C durante 2 h. Em seguida carregaram-se os fragmentos de restrição com *loading buffer* em gel de agarose (com *GelRed* como corante), adicionou-se marcador em ambos os lados do gel e correu-se a eletroforese. Os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados.

3.5.5 PCR da região D1/D2 do gene 26S e sequenciação

Esta técnica foi realizada com base no que foi apresentado por Hajar *et al.* (2012). Para amplificação da região D1/D2 do rDNA da levedura Y2 foram usados os *primers* NL1 (5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG – 3') e NL4 (5' – GGTCCTGTTTCAAGACGG – 3'). Utilizou-se um volume de 50 µL num tubo de PCR, sendo 1 µL da amostra de DNA da levedura e 49 µL de uma solução reacional contendo: 5 µL de tampão *Taq* 10x (com 20 mmol/L de MgCl₂), 5 µL de uma mistura de dNTP's a 2 mmol/L, 1 µL de cada *primer*, 0.25 µL de *Taq* polimerase e água ultrapura. Os parâmetros usados no termociclador foram:

- Desnaturação inicial a 95 °C durante 2 min,
- 35 ciclos: desnaturação a 95 °C, 30 s; emparelhamento a 56.75 °C, 1 min; extensão a 72 °C, 1 min;
- Extensão final a 72 °C, 10 min.

O fragmento D1/D2 amplificado foi enviado para sequenciação na STABVIDA (Oeiras, Portugal). Foi também realizado PCR das regiões ITS da amostra de DNA de Y2 num volume de 50 µL e enviado para sequenciação. Com os resultados fez-se um BLAST das sequências nucleotídicas através da página na internet do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.6 Análise sensorial

A prova organolética dos vinhos produzidos foi feita por um painel heterogéneo de 10 provadores: 5 homens e 5 mulheres, alguns com experiência e outros principiantes. A prova foi realizada de manhã, às 10:30 h, numa sala ampla e fechada, bem iluminada e sem cheiros. Cada provador tinha na sua mesa 7 copos de prova (um por cada ensaio realizado), com um volume constante de 30 mL de vinho. Os copos foram marcados com um código de identificação. Para cada vinho os provadores preencheram a ficha de prova descritiva que se mostra na Figura 7.

FICHA DE PROVA DESCRITIVA – brancos

EXAME VISUAL		Prorador:
Limpidez	0 1 2 3 4 5	Amostra:
Cor	0 1 2 3 4 5	
EXAME OLFATIVO		DESCRITORES
Intensidade	0 1 2 3 4 5	
Floral	0 1 2 3 4 5	
Frutado	0 1 2 3 4 5	
Fruto seco	0 1 2 3 4 5	
Mineral	0 1 2 3 4 5	
Vegetal	0 1 2 3 4 5	
	0 1 2 3 4 5	
Impressão geral	0 1 2 3 4 5	
EXAME GUSTATIVO		
Doçura	0 1 2 3 4 5	
Acidez	0 1 2 3 4 5	
Amargor	0 1 2 3 4 5	
Equilíbrio	0 1 2 3 4 5	
Persistência	0 1 2 3 4 5	
Impressão geral	0 1 2 3 4 5	
Nota final (0 a 20)	OBSERVAÇÕES	

Tabela de correspondências:

Escala de intensidade	Limpidez	Cor
0- nula	0-turvo	0-incolor
1- muito fraca	1-ligeiramente turvo	1-citrino
2- fraca	2-opalino	2-amarelo (palha)
3- média	3-ligeiramente opalino	3-dourado
4- forte	4-límpido	4-topázio
5- muito forte	5-cristalino	

Notação (0 a 20)

<i>Excelente</i>	<i>Muito Bom</i>		<i>Bom</i>		<i>Suficiente</i>	<i>Mediocre</i>		<i>Mau</i>		
20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	0

Figura 7 – Ficha de prova descritiva simplificada para vinhos brancos.

Os descritores olfativos da ficha de prova foram selecionados de entre os mais usuais para os vinhos brancos, e alguns foram simplificados para facilitar a análise aos provadores menos experientes. Os

providores do painel atribuíram valores de intensidade a cada descritor, usando uma escala de zero a cinco. Para cada descritor olfativo e gustativo calculou-se a média geométrica, MG , de acordo com a equação 1 (Norma ISO 11035:1994):

$$MG/\% = \sqrt{F \times I} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

onde F é a frequência relativa do descritor (número de vezes que o descritor é mencionado sobre o número total de vezes que é possível mencioná-lo), e I é a intensidade relativa (a soma das intensidades dadas pelo painel inteiro para um descritor sobre a intensidade máxima possível para este descritor). Os descritores de cada vinho foram classificados pela sua MG , o que, de acordo com a Norma ISO 11035:1994, permite eliminar valores relativamente baixos, que não contribuam para a descrição do produto. Todos os descritores foram considerados por apresentarem $MG > 15\%$ (Genisheva *et al.*, 2014). Para os descritores do exame visual, “Cor” e “Limpidez”, calcularam-se medianas dos valores atribuídos pelo painel; fez-se ainda a média aritmética das notas finais atribuídas a cada vinho.

3.7 Análise aos compostos voláteis do aroma

Os compostos voláteis maioritários do aroma foram doseados por GC-FID (*Gas Chromatography - Flame Ionization Detector*, cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama) e os minoritários por GC-MS (*Gas Chromatography - Mass Spectrometry*, cromatografia gasosa com espectrometria de massa).

3.7.1 Compostos voláteis maioritários

As amostras de vinho foram descongeladas num banho de água fria e centrifugadas (4 °C, 25 min, $FCR = 12\ 225$). Os compostos voláteis maioritários foram analisados diretamente por GC-FID após a adição de 100 µL de solução de 4-nonanol (4.02 g/L em etanol absoluto) a 5 mL de vinho (Genisheva *et al.*, 2014). As amostras foram mantidas a -20 °C até ao momento da análise.

Foi utilizado o equipamento Chrompack GC CP9000 equipado com injetor *split/splitless* e detetor de ionização de chama, e uma coluna Meta-Wax Teknokroma (30 m x 0.25 mm; espessura de filme de 0.2 µm). As temperaturas do injetor e do detetor foram mantidas a 250 °C, sendo a razão de *split* de 15 mL/min. As análises foram realizadas através da injeção de 1 µL de amostra. A temperatura da coluna foi inicialmente mantida a 50 °C durante 2 min, em seguida aumentou de 50 °C a 177.5 °C a uma taxa de 5 °C/min, depois de 177.5 °C até 230 °C a 10 °C/min, e finalmente mantida a 230 °C durante 15 min. O gás transportador foi hélio (GHE4x, Praxair) a um caudal de 1 mL/min (75 kPa à

cabeça da coluna). A análise de cada amostra durou 47.75 min. A quantificação dos compostos voláteis maioritários foi realizada com o *software* Star – Chromatography Workstation versão 6.9.3 (Varian) por comparação dos tempos de retenção com os de substâncias de referência puras.

3.7.2 Compostos voláteis minoritários

Extração líquido-líquido dos compostos voláteis

A extração dos voláteis das amostras de vinho foi feita com base no método descrito por Oliveira *et al.* (2006). Descongelaram-se as amostras de vinho para análise num banho de água fria e centrifugaram-se a 4 °C durante 25 min e $FCR=12\ 225$. Em tubos de cultura (Pyrex, ref. 1636/26MP) adicionaram-se 8 mL de amostra, 100 µL de padrão interno (4-nonanol a 40.2 mg/L em etanol absoluto) e uma barra de agitação magnética. A extração foi feita por mistura da amostra com 400 µL de diclorometano durante 15 min numa placa de agitação magnética. Após arrefecimento a 0 °C durante 10 min, a barra de agitação magnética foi removida e fechou-se o tubo. A fase orgânica foi separada por centrifugação a 4 °C durante 5 min e $FCR=5118$; em seguida arrefeceu-se novamente o tubo a 0 °C durante 5 min. O extrato aromático foi recolhido para um vial utilizando uma pipeta de Pasteur, adicionou-se sulfato de sódio anidro em excesso para desidratar e transferiu-se para um novo vial. Para cada vinho foram realizadas extrações em triplicado e analisadas por GC-MS. As amostras foram mantidas a -20 °C até ao momento da análise.

Análise por GC-MS

A quantificação dos compostos voláteis minoritários foi feita de acordo com Genisheva *et al.* (2014). O equipamento utilizado foi um GC-MS Varian Saturn 2000 equipado com um injetor 1079 e detetor de massa *ion-trap*, e uma coluna Sapiens-Wax MS Teknokroma (30 m x 0.15 mm; espessura de filme de 0.15 µm). O gás de transporte usado foi hélio (GHE4x, Praxair) a um caudal constante de 1.3 mL/min. Para cada extrato foi feita a injeção de 1 µL de amostra em modo *splitless* (durante 30 s; razão de *split* de 30 mL/min). A temperatura do injetor e da linha de transferência foram de 250 °C. A temperatura da coluna foi inicialmente estabelecida a 60 °C durante 2 min e em seguida aumentada de 60 °C a 234 °C a uma taxa de 3 °C/min, aumentada de 234 °C a 260 °C a uma taxa de 5 °C/min, e finalmente mantida a 260 °C durante 5 min. A análise de cada amostra durou um total de 70.20 min. A identificação e análise semiquantitativa (equivalentes de 4-nonanol) dos compostos foi realizada através do *software* Star – Chromatography Workstation versão 6.9.3 (Varian), comparando seus espectros de massa e índices de retenção com os de substâncias de referência puras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta secção são apresentados os dados, depois de tratados, de todas as análises realizadas ao mosto (antes e durante a fermentação) e aos vinhos finalizados, fazendo-se também uma análise crítica dos resultados. Salvo indicação em contrário, os resultados nesta secção correspondem a médias de três leituras, e os erros associados foram calculados pela distribuição *t* de Student, para um grau de confiança de 95 %. As etapas inicialmente previstas para as inoculações sequenciais foram alteradas porque a massa volúmica do mosto era inferior à esperada, e também porque houve dias em que a fermentação avançou muito rapidamente durante a noite (quando não havia supervisão).

4.1 Características do mosto

O mosto de uvas é um líquido turvo e ligeiramente colorido, com uma densidade elevada devido às muitas substâncias químicas que contém. Nele, as leveduras e outros microrganismos encontram a quantidade e variedade de nutrientes necessários para assegurar as suas funções vitais. Os principais são os açúcares, essencialmente glucose e frutose, usados como fontes de carbono e energia. O mosto contém também ácidos orgânicos, sais minerais, compostos azotados diversos e vitaminas, o que o torna num meio de crescimento completo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Os principais parâmetros físico-químicos do mosto utilizado neste trabalho foram determinados utilizando o equipamento OenoFoss™, e são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 — Principais parâmetros físico-químicos do mosto utilizado, determinados com o OenoFoss™, e respetivos erros calculados para 95 % de confiança

<i>SST</i> /(g/kg)	139 ± 4
$\rho_{20^{\circ}\text{C}}$ /(g/L)	1063.6 ± 2.4
<i>AT</i> /(g/L)	5.7 ± 0.2
pH	3.32 ± 0.01
<i>C</i> _{Ac.Tartárico} /(g/L)	4.4 ± 1.1
<i>C</i> _{Ac.Málico} /(g/L)	5.2 ± 0.4
<i>AAN</i> /(mg/L)	180.5 ± 19.1
<i>C</i> _{NH₄⁺} /(mg/L)	124.4 ± 12.7

Os valores de massa volúmica, sólidos solúveis totais e álcool provável estão estreitamente relacionados: a densidade do mosto depende da quantidade de compostos em solução, ou seja, dos sólidos solúveis totais; a grande maioria das substâncias solúveis presentes no mosto são os açúcares, que após conversão pelas leveduras dão origem ao teor alcoólico do vinho. A relação entre a quantidade de álcool produzido durante a fermentação e a concentração inicial de açúcar no mosto é conhecida: cerca de 17 g de açúcar produzem 1 % de etanol, em volume. Existem instrumentos que permitem inferir o álcool provável e/ou os sólidos do mosto por leitura da massa volúmica, nomeadamente alguns densímetros com diferentes escalas (Jacobson, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Além da leitura com o OenoFoss™, a massa volúmica do mosto também foi lida com o densímetro no momento em que o mosto foi recebido, apresentando um valor de 1064 g/L, em concordância com o valor apresentado na Tabela 5. Este valor era mais baixo do que o esperado, de forma que tiveram que se alterar os valores de massa volúmica que tinham sido anteriormente planeadas para realizar as inoculações sequenciais.

O valor de *SST* determinado foi (139 ± 4) g/kg, o que corresponde a cerca de 148 g/L de açúcares dissolvidos, uma valor inferior ao normal, que para mostos de uvas maduras varia geralmente entre 150 g/L e 240 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). A baixa concentração de açúcares tem um impacto proporcional no teor de álcool provável (*AP*), que foi de 8.25 %. Por estes valores conseguiu-se de imediato avaliar que os vinhos produzidos teriam baixo teor alcoólico, porque o valor de álcool provável é meramente indicativo e não toma em consideração que parte dos sólidos dissolvidos não são açúcares (extrato seco), ou são açúcares não fermentescíveis, e por isso não são convertidos em etanol. O valor real de etanol presente nos vinhos finais é inferior ao *AP* (Jacobson, 2006).

O mosto adquirido apresentava um baixo teor em açúcares, o que em parte pode ser explicado pelo facto de o ano de colheita das uvas (2014) ter sido muito chuvoso durante o período do verão, quando ocorre a maturação, principalmente no noroeste do país. Segundo o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (<https://www.ipma.pt/pt/oclima/monitorizacao/>), relativamente ao período de 1971 a 2000, no ano de 2014 a precipitação na região Entre Douro e Minho foi superior à média nos meses de julho (300 % a 400 %), agosto (125 % a 150 %) e setembro (200 % a 250 %). Certamente neste ano foram produzidos mostos de qualidade, mas estes são utilizados diretamente para produção de vinhos. Mostos de uvas de menor qualidade ou menor grau de maturação são sulfitados para utilização posterior noutra tipo de aplicações: o mosto utilizado, possivelmente, foi adquirido sob estas condições.

A acidez do mosto é devida principalmente ao ácido tartárico e ao ácido málico, que são os ácidos

orgânicos presentes em maior concentração nas uvas, seguidos do ácido cítrico. Existem várias formas de expressar a acidez de um mosto de uvas ou vinho, das quais a acidez total (*AT*— a soma de todos os ácidos tituláveis presentes no vinho, normalmente expressa em ácido tartárico por este ser o mais representativo), a acidez volátil (*AV*— expressa em ácido acético por ser o mais abundante dos ácidos voláteis) e o pH (Jacobson, 2006). A acidez do mosto está muito dependente da região, do clima e do grau de maturação das uvas, e pode variar de 4.5 g/L a 15 g/L, expresso como ácido tartárico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Normalmente a acidez do vinho final não difere muito da acidez do mosto, a menos que ocorra fermentação malolática (em que o ácido málico é transformado em láctico, que é um ácido mais fraco), que não é usual em vinhos brancos secos (Delanoe *et al.*, 1987; Jacobson, 2006).

Na determinação dos valores de acidez apresentados na Tabela 5 houve duas fontes de erro que devem ser mencionadas: primeiro, a amostra de mosto que foi guardada para análise posterior foi congelada sem diluição, e por isso uma grande parte do ácido tartárico precipitou sob a forma de sais de tartarato de potássio quando foi colocado a uma temperatura muito baixa; em segundo lugar, as medições com o OenoFoss™ estão sujeitas a erros devido à calibração, que não foi ajustada para mostos e vinhos muito ácidos. Isto pode ajudar a explicar o facto de a concentração de ácido tartárico ser inferior à de ácido málico, o que não é usual, e a *AT* ter um valor baixo.

Os mostos mais ácidos são também os que apresentam um maior conteúdo de aminoácidos, que juntamente com o azoto amoniacal constituem as fontes de azoto facilmente assimiláveis para as leveduras (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). O azoto não é importante apenas para evitar paragens ou abrandamentos na fermentação, mas também pode contribuir para um melhor equilíbrio aromático, uma vez que interfere na síntese de álcoois superiores e de ésteres. Quando a concentração de NH_4^+ é inferior a 25 mg/L, é necessário suplementar o mosto para que não haja paragem da fermentação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Observando a Tabela 5 pode-se afirmar que o mosto utilizado não apresentava este tipo de restrições nutricionais para o desenvolvimento das leveduras.

Ugliano *et al.* (2007), fermentando um mosto de Chardonnay com *S. cerevisiae* AWRI 796, e utilizando diferentes concentrações iniciais de azoto facilmente assimilável, mostraram que um baixo conteúdo inicial de azoto resulta em vinhos mais complexos mas com menos aromas frutados, enquanto um conteúdo de azoto demasiado alto podem levar a vinhos com excesso de ésteres. Um teor de azoto facilmente assimilável no mosto de 320 mg/L foi o que demonstrou o melhor efeito, resultando em vinhos com uma menor concentração de álcoois superiores e melhor balanço de ésteres.

O parâmetro *AAN* representa os aminoácidos primários que a levedura consegue assimilar; a prolina é um aminoácido secundário, que não é assimilado em condições de anaerobiose (Ugliano *et al.*, 2007). A soma das duas fontes de azoto que foram quantificadas, na Tabela 5, dá um valor de azoto facilmente assimilável de 304.9 mg/L, próximo do que foi mencionado como ideal para o aroma do vinho.

4.2 Acompanhamento dos ensaios de fermentação

4.2.1 Alterações químicas do mosto em fermentação

As leveduras necessitam de energia para executar todas as funções metabólicas envolvidas nos processos de crescimento e reprodução. A fermentação alcoólica é a via pela qual as leveduras produzem energia, em condições de anaerobiose, a partir da degradação dos açúcares e formação de produtos secundários consequentemente menos energéticos (Jacobson, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Quando os açúcares fermentescíveis no mosto se esgotam, a população de leveduras entra numa fase de declínio e a fermentação termina.

A melhor forma de monitorizar a fermentação é através da medição da massa volúmica do mosto em fermentação. À medida que os açúcares do mosto são degradados, a massa por área de volume do mosto diminui, porque os sólidos dissolvidos desaparecem e dão lugar ao etanol que é menos denso que a água (Delanoe *et al.*, 1987; Jacobson, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Nos vinhos secos, que têm um baixo teor de açúcares residuais, a fermentação termina quando a massa volúmica estabiliza num valor inferior a 1000 g/L, geralmente entre 990 g/L e 995 g/L. Quando a massa volúmica estabiliza num valor muito superior, de forma não intencional, significa que as leveduras não foram capazes de crescer neste meio e a fermentação parou (Delanoe *et al.*, 1987). Na Figura 8 está representada graficamente a variação da massa volúmica (dados de leituras únicas), para cada método de inoculação testado.

As fermentações do ensaio de controlo com a levedura Y59 e do ensaio de co-inoculação das duas leveduras terminaram ao fim de 6 dias, com massa volúmica muito próxima de 1000 g/L. Já nos restantes ensaios (de inoculação sequencial e de controlo com a levedura Y2), as fermentações foram dadas como terminadas ao fim de 11 dias, com valores de massa volúmica que estabilizaram em valores ligeiramente superiores. A partir do primeiro dia de fermentação tornou-se evidente que a levedura Y59, uma estirpe de *S. cerevisiae*, tem uma taxa de fermentação muito superior à da levedura Y2, outra espécie do género *Saccharomyces*.

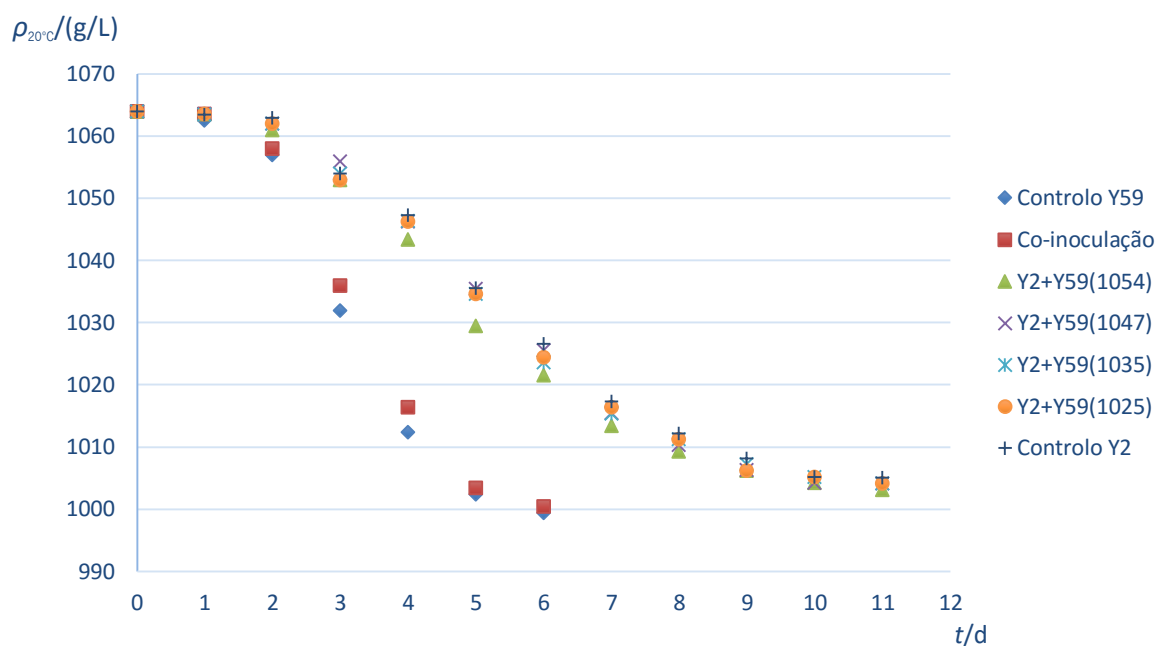


Figura 8 — Representação gráfica da variação da massa volúmica a 20 °C ($\rho_{20^{\circ}\text{C}}$) nos diferentes ensaios em função do tempo de fermentação (t).

No gráfico da Figura 8 está bem evidente que os controlos, inoculados com uma única cultura de leveduras puras, são os extremos, e que as inoculações feitas sequencialmente se mantiveram dentro destes limites. Olhando para os perfis das quatro fermentações sequenciais, embora as diferenças não sejam muito perceptíveis, nota-se que a o ensaio Y2+Y59(1054), onde foi inserida a estirpe Y59 mais cedo, é a que se afasta mais da tendência geral e que termina com menor massa volúmica. Isto significa que a inserção da estirpe Y59 ajudou a uma melhor conclusão da fermentação, que poderia ter sido ainda melhor se tivesse sido feita antes (o que não foi possível devido à baixa densidade inicial do mosto).

A temperatura de fermentação é um parâmetro importante que pode condicionar o crescimento das leveduras e mesmo a formação de compostos voláteis do aroma. A temperatura nos ensaios Controlo Y59 e Co-inoculação manteve-se entre os 17 °C e os 18 °C; nos ensaios de fermentação sequencial variou entre os 16 °C e os 18 °C; finalmente, no Controlo Y2, entre os 15.5 °C e os 18 °C.

Na Figura 9 está representada a variação da concentração de açúcares fermentescíveis, glucose e frutose ($C_{\text{Glu+Fru}}$), no mosto em fermentação. A variação da concentração de açúcares no mosto segue a mesma tendência da densidade, como era de esperar, já que estes parâmetros estão estreitamente relacionados. Mais uma vez verifica-se que nos ensaios de controlo com Y59 e de co-inoculação, o esgotamento dos açúcares ocorreu muito mais rapidamente, o que se deve à presença da levedura Y59, que é mais eficiente neste processo.

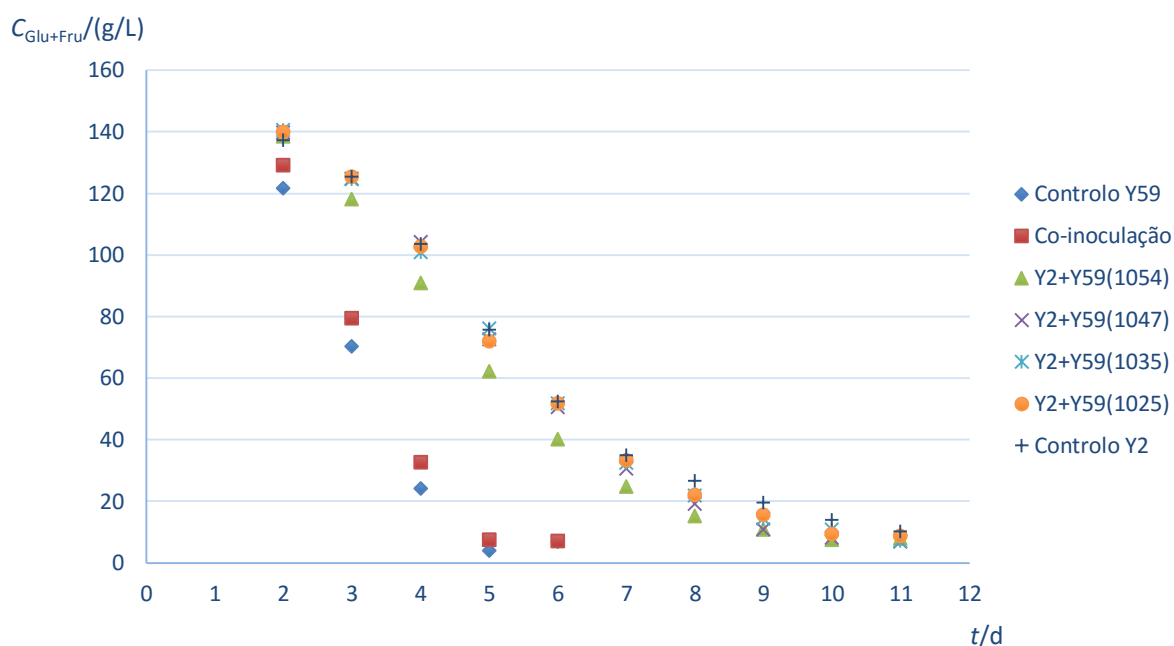


Figura 9 – Perfil da variação da concentração média de açúcares ($C_{Glu+Fru}$) nos diferentes ensaios em função do tempo de fermentação (t).

Na Figura 8 e na Figura 9 consegue-se perceber pelos perfis das inoculações sequenciais que quanto mais cedo se inoculou a segunda levedura, a mais ativa, mais acelerada se tornou a fermentação. A introdução de uma segunda estirpe com boas propriedades fermentativas parece ter efeito na rapidez e eficiência da fermentação, mas além disto é importante que se consigam preservar as propriedades aromáticas da primeira levedura.

O etanol dá aos vinhos o seu principal carácter (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006) e ajuda a protegê-lo de contaminações, e por isso é importante que esteja presente numa concentração adequada. A Figura 10 mostra o aumento do título alcoométrico volúmico (TAV) no mosto dos diferentes ensaios, à medida que vai sendo transformado em vinho. O TAV adquirido de um mosto em fermentação ou vinho é definido no Regulamento CE N.º 491/2009 como o número de volumes de etanol puro, à temperatura de 20 °C, contidos em 100 volumes do produto considerado, à mesma temperatura.

O TAV do mosto em fermentação aumenta de forma inversamente proporcional à variação da concentração de açúcares. Nos ensaios Controlo Y59 e Co-inoculação, o TAV final do mosto foi superior ao dos restantes ensaios, porque houve uma maior conversão dos açúcares. Nos ensaios de fermentação sequencial e no Controlo Y2, a fermentação abrandou e começou a estabilizar antes que todos os açúcares fossem convertidos em etanol.

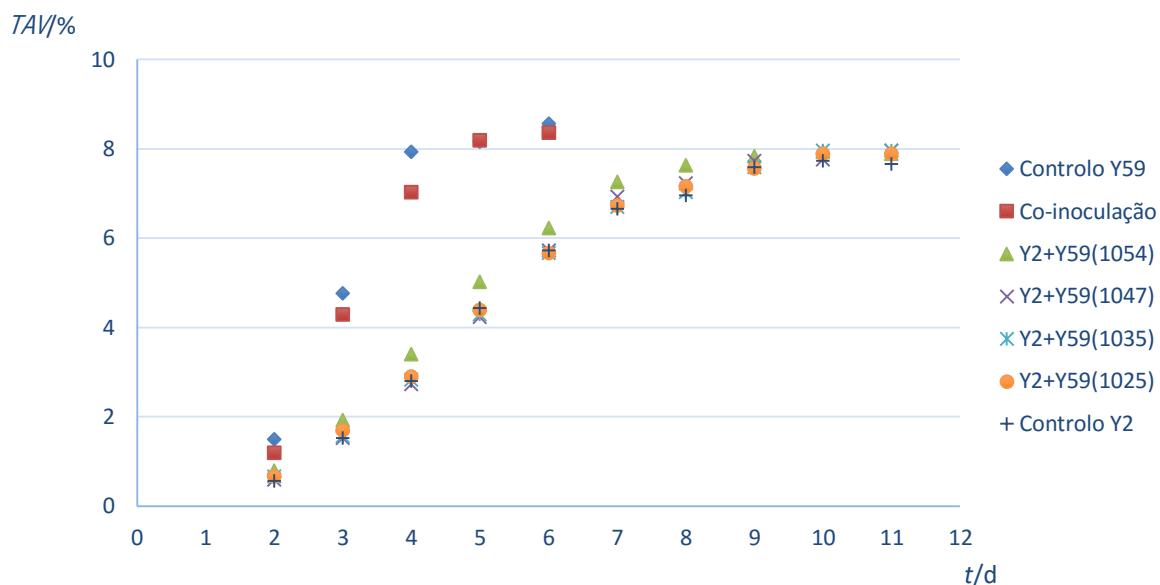


Figura 10 – Variação do título alcoométrico volúmico (*TAV*) nos diferentes ensaios, em função do tempo de fermentação (*t*).

Tendo em conta estes resultados, era esperado que os vinhos finais produzidos por fermentação sequencial e com a levedura Y2 puros tivessem um menor teor alcoólico, e também fossem um pouco mais doces. Pela Figura 10 vê-se ainda que o teor alcoólico no final das fermentações Controlo Y59 e Co-inoculação ficou próximo do *AP* estimado inicialmente.

4.2.2 Evolução da população de leveduras

Para verificar que as estirpes implementadas foram realmente as que foram inoculadas e não provenientes de contaminações, e para tentar perceber se realmente houve crescimento da segunda levedura introduzida no mosto em fermentação, utilizaram-se técnicas de isolamento e de genética molecular já descritas (subcapítulo 3.5).

O PCR interdelta aplicado às amostras de DNA de todos os isolados de cada cuba, retirados a meio e no final da fermentação, apresentou dois perfis principais que se podem ver na Figura 11, com uma escala indicativa do tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb). Para grande parte das amostras não se conseguiu visualizar bandas no gel de eletroforese. Antes de mais, é importante referir que estes poços aparentemente vazios poderiam significar que houve erros crassos na extração do DNA ou no próprio PCR que afetaram algumas amostras, por isso estes procedimentos foram repetidos, levando aos mesmos resultados. O facto de a levedura Y59 apresentar um perfil de amplificação de regiões interdelta comprovou que esta levedura pertence à espécie *S. cerevisiae* (Schuller *et al.*, 2004).

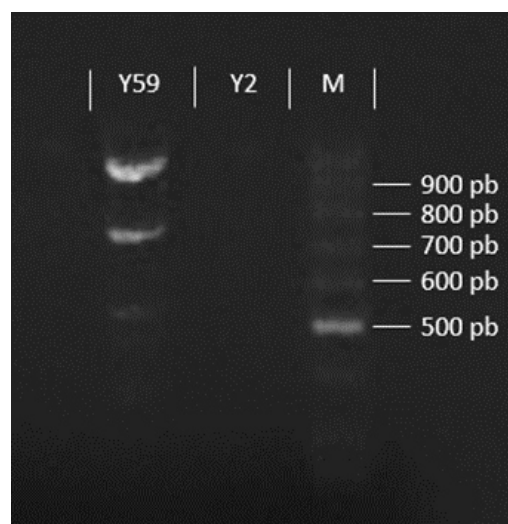


Figura 11 – Perfis de bandas obtidos depois da separação dos produtos do PCR realizado com os *primers* $\delta 2$ e $\delta 12$, visualizados sob luz UV (M – marcador de pesos moleculares; pb – pares de bases).

Da mesma forma, como a levedura Y2 não apresentou qualquer amplificação, partindo do princípio que os passos anteriores foram bem executados, assumiu-se que pertencia a uma espécie diferente. O facto de muitos dos isolados não apresentarem amplificação por esta técnica, assim como a levedura Y2, podia significar que não pertenciam a *S. cerevisiae*, mas continuava sem se provar qual era realmente a sua identidade. Por essa razão foi necessário aplicar outras técnicas de PCR mais específicas, na tentativa de identificar todas as amostras e relacioná-las com segurança a cada um dos controlos.

O PCR-RFLP das regiões ITS e do gene 5.8S do rDNA cria padrões de restrição que permitem distinguir entre espécies do mesmo género (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Montrocher *et al.*, 1998). Esta técnica foi utilizada para validar os resultados do PCR interdelta (garantir que a levedura Y59 era uma estirpe de *S. cerevisiae*, e que a levedura Y2 pertencia a uma outra espécie), e para se obter um perfil identificativo dos isolados que não apresentaram amplificação com o método anterior. Testaram-se duas enzimas de restrição, que produziram os padrões de bandas apresentados na Figura 12. Com a enzima de restrição *HinfI* não se verificou diferença nos padrões de bandas das duas leveduras; já com *HaeIII* obtiveram-se perfis polimórficos que permitiam diferenciar as duas leveduras.

A enzima de restrição *HinfI* corta o fragmento amplificado das regiões ITS e do gene 5.8S em dois locais, que são os mesmos para todas as espécies do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, criando um perfil com três bandas (com tamanhos de 375 pb, 365 pb e 110 pb) (Fernández-Espinar *et al.*, 2000), sendo que duas delas têm tamanhos muito próximos e aparecem sobrepostas no gel de eletroforese, sendo por vezes referidas como uma banda única (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

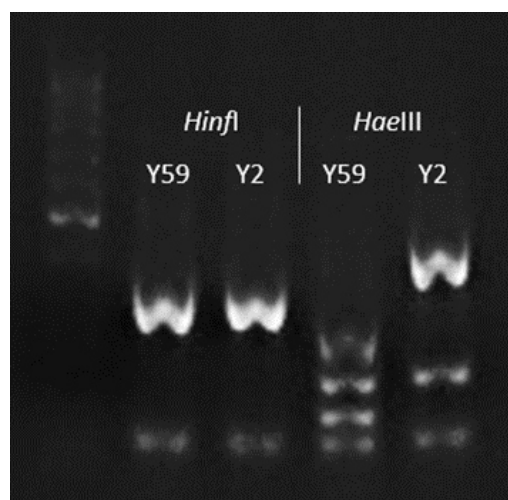


Figura 12 — Perfis de bandas visualizados com luz UV após restrição, com as enzimas *HinfI* e *HaeIII*, dos fragmentos obtidos por PCR com os *primers* ITS1 e ITS4.

Já a enzima *HaeIII* permite separar este complexo de leveduras intimamente relacionadas em dois grupos com diferentes perfis de restrição (Pham *et al.*, 2011). O primeiro, com 4 bandas (tamanhos de 325 pb, 230 pb, 170 pb e 125 pb) ocorre em *S. cerevisiae* e *S. paradoxus*; o segundo, com três bandas (tamanhos de 495 pb, 230 pb e 125 pb) em *S. pastorianus* e na antiga *S. bayanus* (CBS 395), atual *S. uvarum* (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Fernández-Espinar *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2011). Esta técnica, depois de aplicada às leveduras em *stock* usadas como controlo, além de corroborar que a levedura Y59 pertence à espécie *S. cerevisiae*, também restringiu as possibilidades para a identificação da levedura Y2. Aplicando o PCR-RFLP às amostras de DNA dos isolados já foi possível observar, para cada um deles, um perfil de bandas identificativo no gel de agarose.

Para confirmar a identidade da levedura Y2 (que continuava na incerteza entre *S. pastorianus* e *S. uvarum*), os fragmentos da amplificação das regiões ITS e do gene 5.8S desta levedura foram enviados para sequenciação, mas os resultados não foram suficientes para uma decisão definitiva. Foi então realizado um PCR da região D1/D2 do gene 26S do rDNA da levedura Y2, com os *primers* NL1 e NL4, que resultou num fragmento com um tamanho de 680 pb, que se mostra na Figura 13. Este fragmento foi também sequenciado, já que polimorfismos nesta região do genoma permitem segregar espécies de leveduras muito próximas (Pulvirenti *et al.*, 2000), como é o caso das espécies *S. uvarum* e *S. pastorianus*.

Os fragmentos do genoma da levedura Y2 sequenciados foram comparados com bases de dados através de um BLAST na página da internet do NCBI.

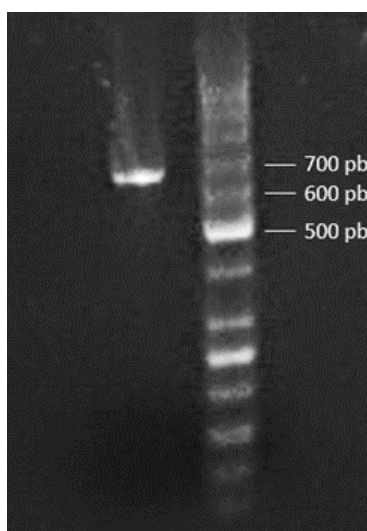


Figura 13 — Fragmento obtido por PCR do genoma da levedura Y2 com os *primers* NL1 e NL4.

O fragmento amplificado por PCR das regiões ITS e do gene 5.8S resultou em 99 % de homologia com várias estirpes de *S. uvarum*, além de *S. bayanus* (devido ao impasse taxonómico que existiu entre as duas espécies) e uma estirpe de *S. pastorianus* (número de acesso: D89888.1), o que não esclareceu completamente a identidade desta levedura. O fragmento da região D1/D2 do gene 26S mostrou uma homologia de 100 % com a estirpe tipo *S. uvarum* CBS 395 (número de acesso: AJ279065.1), podendo-se assim afirmar que a levedura que cresceu nas cubas é a estirpe Y2 e pertence de facto à espécie *S. uvarum*.

Depois de aplicadas estas técnicas às leveduras guardadas em *stock*, que serviram como controlo, e aos isolados das amostras retiradas de cada cuba a meio e no fim da fermentação, conseguiu-se atribuir a cada isolado uma identidade, e todos se mostraram idênticos a um dos controlos (levedura Y2 ou Y59). Desta forma, assumiu-se inicialmente que não houve contaminação do mosto com outras leveduras de espécies diferentes, provenientes das instalações ou do meio ambiente, ou pelo menos não houve uma contaminação que fosse significativa.

Com os resultados sobre a identidade de cada um dos isolados calculou-se a percentagem de implementação de cada estirpe (*I/E*, percentagem calculada com base nos 20 isolados recolhidos de cada amostra) e construíram-se os gráficos de barras da Figura 14, numa tentativa de perceber se a inoculação sequencial das leveduras selecionadas era viável, se houve crescimento da segunda espécie inoculada, e qual das duas acabou por dominar a fermentação.

No ensaio de Co-inoculação é bem aparente que, apesar de as duas leveduras terem sido introduzidas no mosto na mesma concentração e ao mesmo tempo, a levedura Y59 dominou a fermentação.

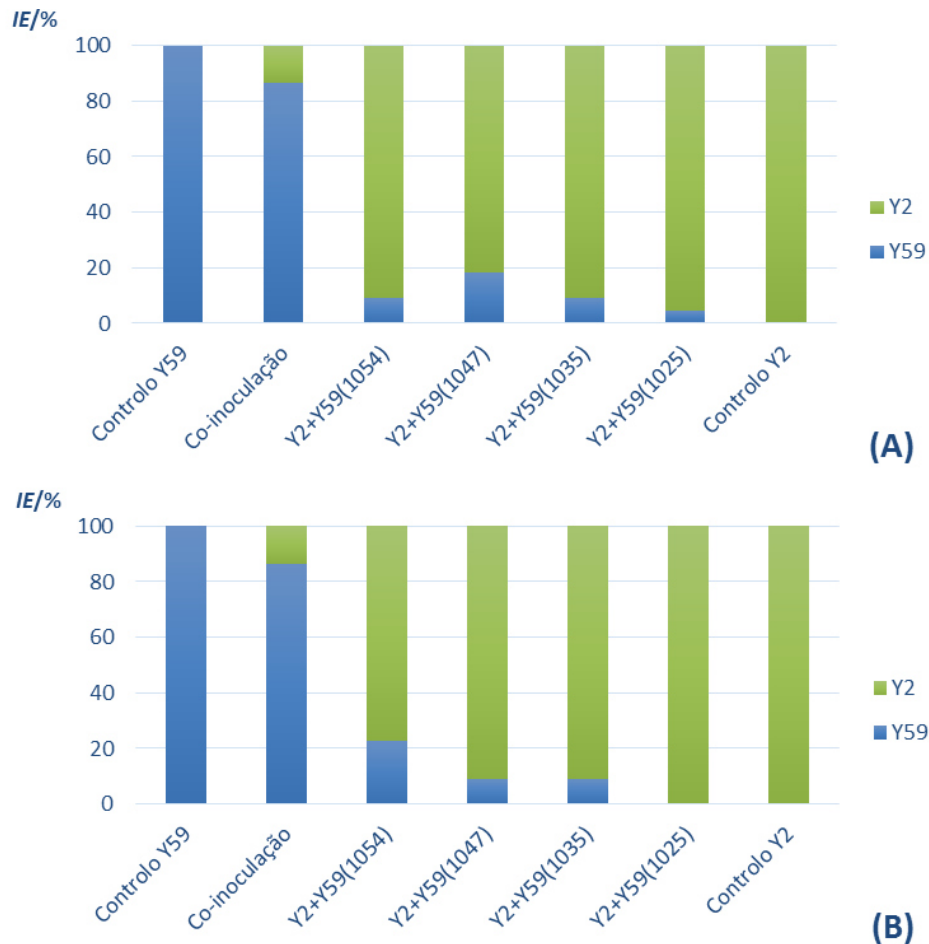


Figura 14 — Representação esquemática da percentagem de Implementação da Estirpe (*IE*%) nos diferentes ensaios realizados, no meio (A) e no final da fermentação (B).

A fermentação no ensaio de Co-inoculação durou 6 dias, e ao 4.º dia (Figura 14 A) a levedura Y59 já representava mais de 80 % da população. Esta percentagem manteve-se até ao final da fermentação (Figura 14 B), o que sugere que apesar da levedura Y59 ser dominante, não reprime totalmente o crescimento da levedura Y2.

Observando os ensaios de fermentação sequencial, nos quais foi primeiro introduzida a estirpe menos ativa, a levedura Y59 conseguiu crescer no meio dominado por outra, quando foi introduzida no mosto com massa volúmica de 1054 g/L. Já quando a levedura Y59 foi introduzida no mosto mais tarde, a levedura Y2 provavelmente já tinha passado a fase de crescimento e encontrava-se em grande concentração, utilizando todos os nutrientes do mosto. A baixa concentração de nutrientes e a escassez de oxigénio no meio são fatores inibitórios que podem ter contribuído para que a levedura Y59 não conseguisse crescer de forma significativa depois de inoculada à massa volúmica de 1047 g/L. Numa fase ainda mais avançada, no ensaio Y2+Y59(1025), a população de Y59 que foi inserida no mosto não

conseguiu chegar ao fim da fermentação, e por isso deste ensaio não foram isoladas leveduras viáveis da estirpe Y2 no final da fermentação, como se observa na Figura 14 B.

Os dados apresentados na Figura 8 e na Figura 14 apontam para que a melhor estratégia é a introdução da levedura Y59 no mosto o mais cedo possível. No entanto, é necessário encontrar um ponto em que a levedura Y2 já tenha sido capaz de formar os compostos do aroma que lhe são característicos, em concentrações suficientes para serem percebidos pelo provador no vinho finalizado. O crescimento da segunda levedura inoculada no mosto em fermentação pode ter sido condicionado pela falta de arejamento do mosto a partir de uma massa volúmica de 1040 g/L, momento a partir do qual não se fez mais a remontagem do mosto, para que as leveduras pudessem fermentar em condições de anaerobiose.

4.3 Características dos vinhos finais

4.3.1 Composição química

Para que possam ser comercializados, os vinhos devem obedecer a regulamentação específica: em Portugal e nos restantes Estados-Membros aplicam-se as leis estabelecidas pela Comissão Europeia. De acordo com o Regulamento CE N.º 491/2009, os vinhos (tranquilos) devem apresentar um título alcoométrico adquirido igual ou superior a 8.5 %, e um título alcoométrico total não superior a 15 %, salvo exceções previstas no anexo III. O mesmo regulamento define para os vinhos uma acidez total (expressa em ácido tartárico) não inferior a 3.5 g/L.

Além dos parâmetros legislados há outros que devem ser controlados, de forma que o vinho não apresente defeitos. Os resultados das análises feitas aos vinhos (em triplicado) com o OenoFoss™ e HPLC são apresentados na Tabela 6, com os erros calculados pela distribuição *t* de Student. Embora tenha sido analisado o ácido láctico nos vinhos finais, os valores não fazem parte da Tabela 6 porque foram sempre nulos (ou com concentração inferior ao limite de deteção do aparelho), o que indica que não ocorreu fermentação malolática.

Como tinha sido previsto no início da fermentação, a concentração de açúcares no mosto não era suficiente para dar origem a vinhos de teor alcoólico apropriado. Nenhum dos vinhos produzidos atingiu o título alcoométrico mínimo estipulado de 8.5 %. Para que tal fosse possível seria necessário fazer um enriquecimento do mosto inicial, de acordo com o previsto no Regulamento CE N.º 491/2009. Todos os vinhos terminaram com uma *AT* superior ao limite mínimo estipulado de 3.5 g/L.

Tabela 6 – Resultados das análises feitas aos vinhos finais, com os respetivos erros calculados para 95 % de confiança

	Controlo Y59	Co-inoculação	Y2+Y59 (1054)	Y2+Y59 (1047)	Y2+Y59 (1035)	Y2+Y59 (1025)	Controlo Y2
<i>TAV</i> /%	8.1 ± 0.5	8.2 ± 0.2	7.6 ± 0.6	7.6 ± 0.2	7.7 ± 0.2	7.8 ± 0.1	7.6 ± 0.8
<i>AT</i> /(g/L)	8.1 ± 0.1	7.9 ± 0.4	8.7 ± 0.5	8.7 ± 0.4	8.7 ± 0.3	8.7 ± 0	8.6 ± 0.5
<i>AV</i> /(g/L)	0.39 ± 0.11	0.40 ± 0.04	0.52 ± 0.01	0.49 ± 0.09	0.50 ± 0.07	0.52 ± 0.01	0.48 ± 0.15
pH	3.19 ± 0.13	3.16 ± 0.03	3.25 ± 0.02	3.26 ± 0.04	3.25 ± 0.04	3.24 ± 0.01	3.24 ± 0.05
<i>C</i> _{Gluc} /(g/L)	4.57 ± 0.30	4.64 ± 0.30	4.60 ± 0.30	4.68 ± 0.30	4.57 ± 0.30	4.24 ± 0.28	4.19 ± 0.28
<i>C</i> _{Fru} /(g/L)	0.43 ± 0.19	0.46 ± 0.19	3.86 ± 0.23	3.53 ± 0.22	3.94 ± 0.23	4.52 ± 0.25	5.92 ± 0.35
<i>C</i> _{Gli} /(g/L)	4.39 ± 0.62	4.50 ± 1.05	7.74 ± 0.09	8.25 ± 0.08	7.97 ± 0.08	7.64 ± 0.09	7.79 ± 0.09

O valor de acidez total (*AT*) dos vinhos foi também superior ao que foi lido no mosto, e está mais próximo da realidade porque as amostras de vinho não foram congeladas antes de analisar com o OenoFoss™, e portanto não houve grande perda de acidez por precipitação de sais de tartarato. Os vinhos produzidos por Controlo Y59 e Co-inoculação, onde a levedura Y59 foi o principal interveniente na fermentação, são ligeiramente menos ácidos.

O maior contribuinte para a acidez volátil (*AV*) nos vinhos é o ácido acético. Este forma-se durante a fermentação em níveis que rondam normalmente os 0.2 g/L a 0.4 g/L; quando em concentrações superiores a 0.8 g/L ou 0.9 g/L, o ácido acético torna-se indesejável, porque é perceptível no vinho pelo seu cheiro a vinagre (Jacobson, 2006). Nos vinhos produzidos a *AV* não ultrapassou este limite. Mais uma vez os vinhos Controlo Y59 e Co-inoculação apresentam valores inferiores de acidez volátil.

O pH do vinho está dependente da sua acidez, situa-se geralmente entre 2.8 e 3.8 (Delanoe *et al.*, 1987; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), e foi dentro desta gama que se mantiveram os valores dos vinhos produzidos. O pH é um bom indicador da propensão do vinho para sofrer contaminações: acima de 3.5 o vinho não tem acidez suficiente para ficar protegido contra o crescimento de microrganismos, como bactérias acéticas (Delanoe *et al.*, 1987).

De acordo com o Regulamento CE N.º 607/2009, um vinho é considerado seco se o teor de açúcares não for superior a 4 g/L, ou 9 g/L se a acidez total não for inferior em mais de 2 g/L ao teor de açúcares residual. Todos os vinhos produzidos têm um teor de açúcares residuais superior a 4 g/L e inferior a 9 g/L, com exceção do Controlo Y2. Nos vinhos Controlo Y59, Co-inoculação, Y2+Y59(1054), Y2+Y59(1047) e Y2+Y59(1035), o valor de *AT* é superior ao valor da soma dos açúcares residuais, e no

vinho Y2+Y59(1025) os valores quase se igualam. A elevada acidez permite então classificar estes vinhos como secos. No caso do vinho Controlo Y2, a soma a concentração de açúcares residuais é superior a 9 g/L, e por isso seria considerado um vinho adomado. Pelos valores da Tabela 6 verifica-se que a concentração final de glucose nos diferentes vinhos foi quase constante, e o que realmente fez diferença no teor de açúcares residuais foi a concentração de frutose.

Depois do etanol, o glicerol é o produto mais importante da fermentação alcoólica, e a sua concentração nos vinhos varia geralmente de 5 g/L a 8 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). O glicerol tem um sabor adocicado, mas que é mascarado no vinho, e forma-se principalmente no início da fermentação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Os vinhos em que foi inoculada primeiro a levedura Y2 apresentaram uma concentração de glicerol marcadamente superior. Esta é uma das características mais distintivas entre os perfis de fermentação de *S. cerevisiae* e *S. uvarum* (Pulvirenti *et al.*, 2000).

4.3.2 Características organoléticas

Na avaliação visual dos vinhos, a mediana das classificações dos provadores teve como resultado uma cor “amarelo palha” para a maioria, com exceção do vinho Controlo Y2 que foi classificado como “citrino”. Quanto à limpidez, a mediana da classificação dos vinhos variou entre “límpido” e “ligeiramente opalino”. Os considerados mais límpidos foram os vinhos Controlo Y59, Co-inoculação e Controlo Y2.

Os resultados do exame gustativo dos vinhos, obtidos com a metodologia explicada na secção 3.6, são apresentados na Figura 15. Nos parâmetros de persistência e equilíbrio do gosto, o painel de provadores no global não detetou diferenças muito significativas entre os diferentes vinhos. As classificações destes parâmetros situam-se entre os 60 % e os 80 %, sendo difícil de distinguir entre as séries. O amargor dos vinhos provém principalmente dos compostos fenólicos das uvas e películas e, como o mosto utilizado foi o mesmo em todos os ensaios, é pouco provável que os vinhos tenham diferentes conteúdos de substâncias amargas. O que acontece é que os açúcares residuais no vinho ajudam a disfarçar o amargor, e por isso o vinho Controlo Y2 que terminou com maior concentrações de açúcares não fermentados foi classificado como menos amargo, e nos vinhos Controlo Y59 e Co-inoculação o amargor foi mais perceptível por serem vinhos mais secos. Da mesma forma, nos vinhos mais doces a acidez é menos perceptível, o que explica o facto de o vinho Controlo Y2 ser considerado menos ácido, apesar de na verdade ser dos vinhos com maior AT. Os vinhos Controlo Y59 e Co-inoculação têm menor AT, mas foram considerados mais ácidos pelos provadores, possivelmente por terem baixo teor de açúcares residuais. O vinho Y2+Y59(1025) desvia-se desta tendência, mas não se encontra explicação para tal.

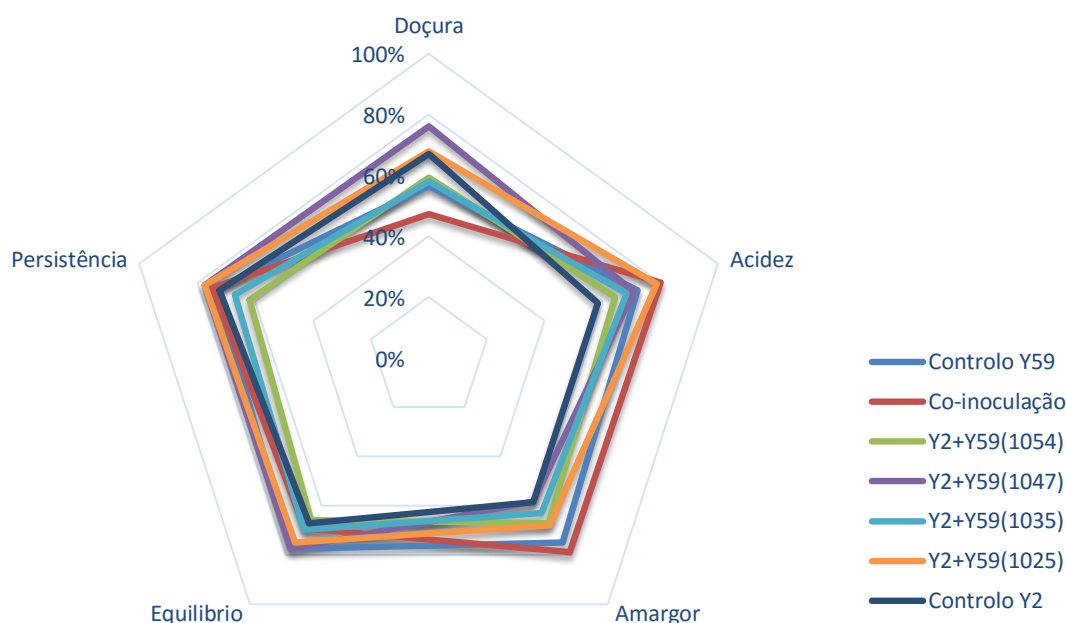


Figura 15 — Resultado das *MG* calculadas para os descritores gustativos dos diferentes vinhos, avaliados pelo painel de provadores durante a análise sensorial.

Os vinhos Controlo Y59 e Co-inoculação foram notados pelo painel de provadores como os menos doces, o que está de acordo com os dados analíticos. Os vinhos Y2+Y59(1025) e Controlo Y2 foram dos mais doces, o que também está de acordo com as concentrações finais de açúcares que foram determinadas. No entanto o vinho Y2+Y59(1047) foi classificado como o mais doce entre todos, resultado que não é apoiado pelos dados das análises químicas. Isto só se poderá explicar pelo impacto da maior concentração de glicerol, ou pela presença de aromas com notas adocicadas que provocam esta sensação nos provadores.

Além dos aspetos gustativos, os provadores deram também a sua avaliação quanto às características olfativas de cada vinho, nomeadamente sobre os descritores aromáticos mais adequados e a intensidade da sensação olfativa (Figura 16). Os descritores sugeridos na ficha de prova abrangem as principais características aromáticas normalmente atribuídas aos vinhos brancos. Como forma de facilitar a análise aos provadores colocou-se, por exemplo, apenas o descritor “Frutado”, mas este pode englobar “fruto citrino”, “fruto de árvore” e mesmo “fruto tropical”.

Os descritores “Mineral” e “Fruto seco” foram os menos significativos, com médias geométricas abaixo dos 50 % e onde não há uma distinção clara dos vinhos. Para o descritor de aroma “Vegetal” também não existe uma tendência clara dos resultados dos diferentes vinhos.

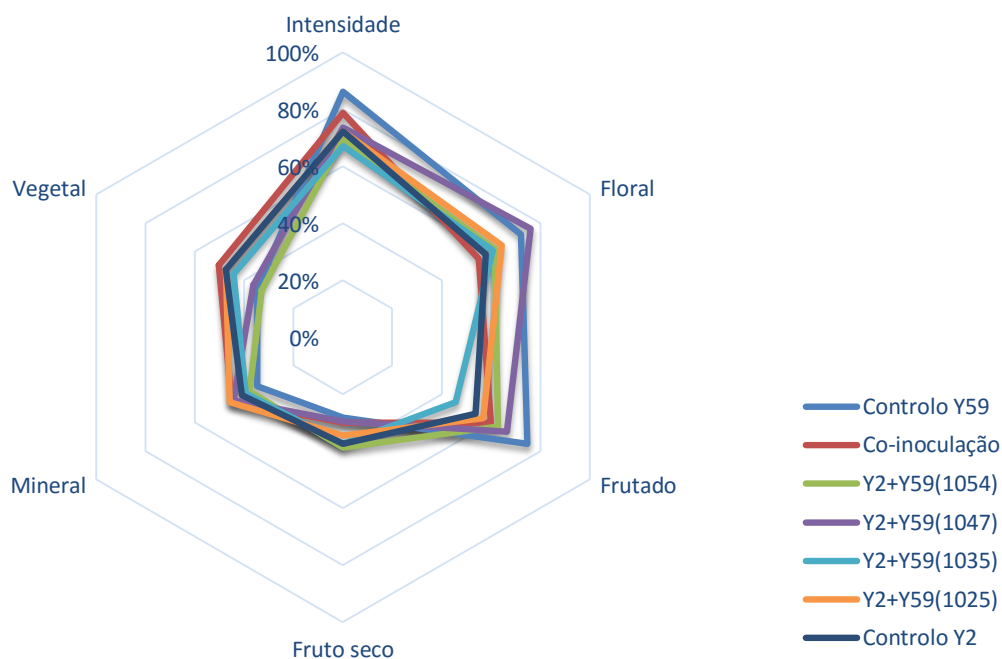


Figura 16 – Resultado das *MG* calculadas para os descritores olfativos dos diferentes vinhos, avaliados durante a análise sensorial.

Os vinhos avaliados como tendo um aroma mais “Frutado” foram, por ordem decrescente, os vinhos Controlo Y59, Y2+Y59(1047) e Y2+Y59(1054). Os vinhos onde a levedura Y2 teve um papel mais relevante – vinhos Y2+Y59(1035), Y2+Y59(1025) e Controlo Y2 – foram os que o painel considerou menos frutados. Os vinhos Controlo Y59 e Y2+Y59(1047) também se destacam dos restantes nos aromas florais. Os provadores consideraram como mais intensos ao nível do aroma os vinhos Controlo Y59 e Co-inoculação.

No final da avaliação do gosto e do aroma dos vinhos foi pedido aos provadores que dessem uma nota final entre 0 e 20 a cada vinho, tendo em conta todos os parâmetros avaliados e o gosto pessoal. O vinho que obteve a melhor nota média final foi o vinho Controlo Y2, produzido com esta levedura pura, que foi avaliado em 13.4 (“Bom”). Destacaram-se também os vinhos Controlo Y59 e Y2+Y59(1047), ambos com uma nota de 12.4 (“Bom”), e o menos apreciado foi o vinho de Co-inoculação com uma avaliação de 10.5 (“Suficiente”), produzido por inoculação das duas espécies.

4.3.3 Compostos voláteis do aroma

Para entender melhor as diferenças a nível organolético detetadas pelo painel de provadores, é interessante confrontar os dados da análise sensorial com dados instrumentais. Os resultados da análise aos compostos voláteis maioritários feita por GC-FID são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentrações médias (*C*) dos compostos voláteis maioritários detetados nos vinhos por análise semiquantitativa com GC-FID, erros calculados para 95 % de confiança e *LPO* para cada composto

		Controlo Y59	Co-inoculação	Y2+Y59 (1054)	Y2+Y59 (1047)	Y2+Y59 (1035)	Y2+Y59 (1025)	Controlo Y2
Composto	<i>LPO</i> /(mg/L)	<i>C</i> /(mg/L)	<i>C</i> /(mg/L)	<i>C</i> /(mg/L)	<i>C</i> /(mg/L)	<i>C</i> /(mg/L)	<i>C</i> /(mg/L)	<i>C</i> /(mg/L)
Acetaldeído	10 ^(a)	5.5 ±3.1	3.8 ±6.0	13.6 ±14.7	3.2 ±1.8	6.0 ±16.9	3.2 ±5.0	3.8 ±2.2
Acetato de etilo	12.3 ^(b)	12.0 ±0.6	9.7 ±1.2	12.9 ±3.7	15.1 ±0.6	18.1 ±11.4	12.2 ±1.1	12.5 ±7.0
Metanol	668 ^(a)	40.7 ±11.5	32.8 ±19.2	34.4 ±6.4	42.5 ±7.1	34.9 ±17.0	33.4 ±29.9	38.5 ±7.4
Álcoois superiores								
1-propanol	830 ^(a)	16.1 ±1.1	15.3 ±6.6	18.9 ±2.1	22.0 ±7.4	17.2 ±5.2	16.3 ±11.6	19.1 ±7.4
2-metil-1-propanol	40 ^(a)	30.8 ±1.9	28.2 ±8.6	19.0 ±3.0	22.1 ±5.0	18.6 ±4.6	17.1 ±9.9	18.3 ±7.2
2-metil-1-butanol	—	20.9 ±1.1	22.2 ±10.2	22.8 ±3.1	25.2 ±4.4	22.0 ±4.3	19.2 ±8.8	23.2 ±8.9
3-metil-1-butanol	30 ^(a)	78.6 ±4.4	69.9 ±19.5	75.8 ±11.1	87.1 ±15.5	73.9 ±16.6	66.3 ±30.1	76.8 ±29.0
2-feniletanol	14 ^(c)	16.9 ±6.1	13.1 ±12.3	47.6 ±32.2	38.6 ±26.5	35.4 ±41.2	26.1 ±22.1	35.8 ±11.6
Total		163 ±14	149 ±31	184 ±51	195 ±59	167 ±72	145 ±77	173 ±58

(a) – Moreno *et al.*, 2005; (b) – Escudero *et al.*, 2004; (c) – Ferreira *et al.*, 2000.

No vinho Y2+Y59(1054) registou-se uma maior concentração de acetaldeído, composto resultante da oxidação do etanol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), o que poderia ser indicativo da ocorrência de algum tipo de contaminação não detetada nas análises microbiológicas; no entanto, não se pode afirmar nada com certeza, porque o erro associado é muito grande. Este parece ter sido o único parâmetro que se afastou significativamente da tendência geral dos resultados.

Houve alguns compostos que se destacaram por apresentarem uma concentração média significativamente superior ao seu limiar de perceção olfativa (*LPO*), nomeadamente o acetato de etilo, o 3-metil-1-butanol e o 2-feniletanol. O acetato de etilo pode ter contribuído com notas de frutado e adocicado nos vinhos Y2+Y59(1047) e Y2+Y59(1035) produzidos por fermentação sequencial. O 3-metil-1-butanol pode ser perceptível em todos os vinhos, mas foi no vinho Y2+Y59(1047) que a sua concentração foi mais elevada, podendo este ter um aroma ligeiramente mais adocicado e a banana.

As concentrações de 2-feniletanol são um bom exemplo da complexidade de interações que podem ocorrer quando duas leveduras estão envolvidas na fermentação alcoólica do mesmo mosto. A espécie *S. uvarum* é conhecida por produzir mais 2-feniletanol do que *S. cerevisiae* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), que confere aos vinhos um odor a rosas, floral. Embora os valores de concentração estejam sujeitos a erros muito significativos, a concentração de 2-feniletanol no vinho de controlo com *S. uvarum* (Controlo Y2) é notoriamente superior à do vinho Controlo Y59, produzido somente com *S. cerevisiae*.

No vinho onde foi feita co-inoculação, a concentração de 2-feniletanol não atingiu o limiar de perceção, mas nos vinhos resultantes de inoculação sequencial acontece o contrário. No vinho Y2+Y59(1054) houve a maior acumulação do composto em análise (superior a ambos os controlos), e quanto mais tarde foi realizada a inoculação da segunda levedura mais baixa foi a sua concentração no vinho. Isto sugere que há um efeito sinérgico entre as leveduras na produção deste composto, mas apenas quando a inoculação é realizada num momento apropriado.

Observando, na Tabela 7, a soma das concentrações médias de todos os álcoois superiores para cada vinho, verifica-se que a concentração total nunca ultrapassa os 200 mg/L, ou seja, não atinge o limite a partir do qual o seu contributo para o vinho pode, porventura, tornar-se negativo (acima dos 300 mg/L) (Lambrechts e Pretorius, 2000).

Na Tabela 8 são apresentadas as concentrações médias dos compostos voláteis minoritários do aroma. No geral, os compostos minoritários com maior contributo para o aroma dos vinhos produzidos foram os ésteres, os fenóis voláteis e alguns ácidos gordos voláteis. Os compostos em C₆ e os álcoois monoterpénicos estavam presentes em concentrações muito inferiores ao seu limiar de perceção olfativo. Embora uma grande parte dos compostos voláteis analisados não tenha atingido o *LPO*, eles podem mesmo assim contribuir para o aroma dos vinhos, acentuando ou disfarçando outros odores (Escudero *et al.*, 2004).

Entre os ésteres, os que mais se destacaram foram o hexanoato de etilo (aroma a maçã, frutado e adocicado), o octanoato de etilo (aroma a maçã, adocicado e frutado) e o acetato de 3-metil-1-butilo (aroma a banana), que tiveram as concentrações máximas no vinho Controlo Y59. Este foi também o vinho com maior conteúdo total em ésteres, seguido do vinho produzido por co-inoculação. Nos vinhos produzidos por fermentação sequencial os ésteres referidos aparecem em concentrações muito mais baixas, embora ainda acima do *LPO*.

No vinho Controlo Y2 (inoculado apenas com *S. uvarum*) e nos vinhos de fermentação sequencial Y2+Y59(1054), Y2+Y59(1047) e Y2+Y59(1035), o acetato de 2-feniletano (aroma a rosas, mel e adocicado) está presente acima do *LPO*, e a sua concentração diminui à medida que a inoculação com *S. cerevisiae* foi realizada mais tardiamente. Desta forma, no vinho Y2+Y59(1025), que foi o último onde se introduziu *S. cerevisiae*, a concentração de acetato de 2-feniletano é mais baixa e inferior ao *LPO*. Mais uma vez se vê que a inoculação sequencial tardia teve um efeito menos positivo sobre os compostos de aroma.

Tabela 8 – Concentrações médias (*C*) dos compostos voláteis minoritários detetados nos vinhos por análise semiquantitativa com GC-MS, erros calculados para 95 % de confiança e *LPO* para cada composto

		Controlo Y59	Co-inoculação	Y2+Y59 (1054)	Y2+Y59 (1047)	Y2+Y59 (1035)	Y2+Y59 (1025)	Controlo Y2
Composto	<i>LPO</i> (mg/L)	<i>C</i> (µg/L)	<i>C</i> (µg/L)	<i>C</i> (µg/L)	<i>C</i> (µg/L)	<i>C</i> (µg/L)	<i>C</i> (µg/L)	<i>C</i> (µg/L)
Metionol	1000 ^(a)	55 ±15	77 ±17	31 ±7	27 ±12	30 ±19	23 ±12	26 ±11
Ésteres								
Butirato de etilo	20 ^(b)	39 ±60	32 ±25	13 ±4	12 ±14	(n.d.)	4 ±6	(n.d.)
Hexanoato de etilo	14 ^(a)	217 ±70	202 ±42	75 ±5	84 ±28	71 ±7	57 ±53	66 ±10
Octanoato de etilo	5 ^(a)	105 ±104	137 ±10	45 ±2	41 ±5	30 ±2	29 ±28	21 ±6
Acetato de 3-metil-1-butilo	30 ^(c)	749 ±142	577 ±151	90 ±8	97 ±29	89 ±14	68 ±60	83 ±24
Acetato de hexilo	1000 ^(d)	59 ±26	54 ±9	4 ±3	6 ±6	5 ±2	4 ±4	4 ±0
Acetato 2-feniletilo	250 ^(c)	189 ±37	193 ±16	296 ±11	283 ±9	279 ±24	237 ±208	286 ±22
Total		1358±335	1196±218	523±12	516±72	476±45	398±357	460±32
Compostos em C₆								
1-hexanol	8000 ^(e)	168 ±30	185 ±8	198 ±27	185 ±64	202 ±62	147 ±137	204 ±47
E3-hexenol	—	5 ±2	6 ±0	6 ±1	6 ±1	7 ±3	6 ±4	7 ±1
Z3-hexenol	400 ^(e)	4 ±5	7 ±2	10 ±1	10 ±13	11 ±4	9 ±5	10 ±2
Total		178 ±37	198 ±7	214 ±29	198 ±76	220 ±70	161 ±146	221 ±45
Terpenos								
Linalol	25.2 ^(a)	6 ±4	8 ±4	8 ±1	8 ±2	8 ±1	6 ±6	7 ±10
HO-trienol	110 ^(f)	5 ±3	5 ±6	5 ±1	3 ±11	2 ±15	5 ±5	4 ±7
α-terpineol	250 ^(a)	18 ±7	19 ±3	19 ±1	16 ±8	19 ±2	14 ±12	14 ±15
Citronelol	100 ^(c)	1 ±0	(n.d.)	3 ±2	2 ±20	2 ±1	1 ±0	(n.d.)
Total		30 ±12	32 ±13	35 ±2	27 ±16	31 ±4	26 ±23	25 ±32
Ácidos gordos								
Ác. 2-metilpropanóico	2300 ^(a)	12 ±6	13 ±7	23 ±7	20 ±4	22 ±8	20 ±9	17 ±12
Ácido butírico	173 ^(a)	5 ±2	5 ±4	5 ±1	3 ±2	4 ±2	4 ±2	4 ±9
Ác. 2+3-metilbutírico	33.4 ^(a)	17 ±6	18 ±14	70 ±13	65 ±10	65 ±26	60 ±35	61 ±15
Ác. Hexanóico	420 ^(a)	356 ±75	325 ±56	172 ±28	155 ±6	155 ±49	130 ±77	137 ±23
Ác. Octanóico	500 ^(a)	1930 ±556	1885 ±68	1014 ±76	894 ±59	752 ±77	649 ±585	622 ±44
Ác. Decanóico	1000 ^(a)	285 ±9	248 ±72	616 ±111	525 ±130	388 ±32	360 ±395	380 ±100
Total		2604±620	2494±149	1900±101	1663±137	1386±29	1223±1073	1221±148
Fenóis voláteis								
4-vinilguaiacol	130 ^(g)	213 ±41	223 ±18	122 ±4	95 ±62	102 ±5	79 ±72	94 ±26
4-vinilfenol	180 ^(g)	445 ±136	468 ±57	321 ±43	283 ±7	300 ±80	222 ±150	268 ±23
Total		658 ±177	691 ±76	443 ±46	379 ±55	402 ±82	301 ±221	361 ±35

(n.d.) – não detetado, em pelo menos duas das amostras. (a) – Ferreira *et al.*, 2000; (b) – Guth, 1997a; (c) – Moreno *et al.*, 2005; (d) – Chaves *et al.*, 2007; (e) – Guth, 1997b; (f) – Simpson, 1979; (g) – Boidron *et al.*, 1988.

O facto de o acetato de 2-feniletano ser predominante nos vinhos fermentados com *S. uvarum* é facilmente explicado, se relembrarmos que este é um acetato de um álcool superior — o 2-feniletanol — e que há uma reação de equilíbrio que envolve ésteres e álcoois. Como estes vinhos eram mais ricos em 2-feniletanol, também o são em acetato de 2-feniletano.

Os ácidos gordos voláteis que se destacaram por estarem presentes em concentrações acima do seu *LPO* foram os ácidos 2-metilbutírico e 3-metilbutírico, e o ácido octanóico, que podem dar ao vinho odores de óleo vegetal, queijo ou mesmo suor (mas que fazem parte do equilíbrio olfativo dos vinhos). Os primeiros só são significativos nos vinhos fermentados com *S. uvarum*. Já o ácido octanóico está presente em níveis médios muito superiores ao seu *LPO*, principalmente nos vinhos Controlo Y59 e Co-inoculação, onde foi *S. cerevisiae* que teve o papel relevante na fermentação. É também nestes vinhos que o teor total em ácidos gordos voláteis é maior, quando feita a soma das concentrações médias.

O último grupo de compostos que apresentou concentrações acima do *LPO* foi o dos fenóis voláteis. As maiores concentrações de 4-vinilfenol (guache, cravo) e 4-vinilguaiacol (cravo-da-índia, especiarias) foram registadas nos vinhos Controlo Y59 e Co-inoculação, mas a soma das concentrações médias dos dois compostos em cada vinho não atingiu os 725 µg/L, limite a partir do qual se começam a sentir odores fenólicos desagradáveis (Lambrechts e Pretorius, 2000; Oliveira, 2000). Nos vinhos produzidos por fermentação sequencial e no Controlo Y2 apenas o 4-vinilfenol atingiu o *LPO*.

Relativamente à Figura 15 foi dito que poderiam existir certos compostos de aroma no vinho Y2+Y59(1047) que dessem aos provadores a impressão de que este era o vinho mais doce. As análises cromatográficas comprovam que no vinho Y2+Y59(1047) há uma maior concentração de glicerol, acetato de etilo e 3-metil-1-butanol, substâncias associadas a um sabor adocicado.

Como os compostos em C₆ não ultrapassaram o *LPO*, na Figura 16 o descritor de aroma “vegetal” não foi dos mais significativos. A maior intensidade aromática atribuída aos vinhos Controlo Y59 e Co-inoculação pode estar relacionada com o facto de estes serem os vinhos com maiores concentrações totais de ésteres etílicos de ácidos gordos, de ácidos gordos voláteis e de fenóis voláteis.

O vinho Y2+Y59(1047) foi considerado o mais floral devido à elevada concentração de 2-feniletanol e de acetato de 2-feniletano (embora o vinho Y2+Y59(1054) tenha concentrações médias mais altas de ambos os compostos). O vinho Controlo Y59 foi o que apresentou maior conteúdo em ésteres, e foi avaliado pelo painel de provadores como o mais frutado.

Apesar de o vinho Controlo Y2 não se ter evidenciado em nenhum dos parâmetros da prova organolética

nem em termos de concentração dos compostos aromáticos, foi o que obteve a maior pontuação média pelos membros do painel de provadores. Tal pode ser devido ao facto de este vinho ter maior teor de açúcares residuais e um perfil aromático mais equilibrado, já que não é excessivamente rico em nenhuma família de compostos nem em um composto particular. Este vinho pode ainda ter-se destacado dos restantes por ser diferente dos vinhos a que os consumidores estão habituados, já que foi fermentado unicamente com uma levedura não convencional, *S. uvarum*.

Em seguida na preferência do painel ficaram o vinho Controlo Y59 (mais frutado) e o vinho Y2+Y59(1047) (mais floral). O vinho Y2+Y59(1054) apresentou-se ligeiramente mais rico que o Y2+Y59(1047) na maioria dos compostos analisados, verificando-se que de alguma forma a inoculação sequencial feita mais cedo contribui para um acumular de compostos do aroma produzidos pelas duas leveduras. No entanto, segundo os dados da prova organolética, o resultado não superou o do vinho Y2+Y59(1047). Seria necessário repetir estes ensaios, já que o vinho Y2+Y59(1054) demonstrou uma anormalidade na quantidade de acetaldeído produzido.

Apesar de tudo, a prova organolética serviu para mostrar que, na matriz complexa que é o vinho, dados instrumentais não são suficientes para prever o resultado organolético final de um produto ou a sua aceitação pelos consumidores. Os variados compostos de aroma tomam papéis diferentes no vinho, acentuando ou disfarçando o contributo de outras substâncias. O equilíbrio dos sabores e dos aromas, e a sensação global percebida pelo provador não podem, por isso, ser quantificados por meios instrumentais.

5. CONCLUSÕES

Pela análise de todos os resultados foi evidente que a levedura Y59 tem uma taxa de fermentação muito superior à da levedura Y2. Por essa razão, entre as fermentações sequenciais, o ensaio Y2+Y59(1054) teve um decréscimo de densidade mais acentuado e uma massa volúmica final mais baixa. A estirpe Y59 teve um papel importante na finalização da fermentação, que poderia ter sido mais evidente se a densidade inicial do mosto permitisse fazer a inoculação sequencial mais cedo. A alta eficiência fermentativa da estirpe Y59 também se fez notar pela menor concentração final de açúcares nos vinhos Controlo Y59 e Co inoculação, que terminaram com um teor alcoólico mais próximo do que tinha sido estimado.

As técnicas de microbiologia e biologia molecular empregues evidenciaram que a levedura Y59 é uma estirpe de *S. cerevisiae*, e que a levedura Y2 é uma estirpe de *S. uvarum*. As análises às amostras de biomassa que foram retiradas no meio e no final de cada fermentação mostraram que a maior parte dos isolados do ensaio de Co-inoculação pertenciam à estirpe Y59, ou seja, esta levedura dominou a fermentação, mas não reprimiu totalmente o crescimento da levedura Y2. As análises microbiológicas mostraram que a segunda levedura inoculada conseguiu crescer e mesmo aumentar a sua concentração no meio quando inserida no mosto em fermentação à massa volúmica de 1054 g/L, mas a partir deste valor o seu crescimento no mosto em fermentação já não foi significativo. Estes resultados indicam que a fermentação sequencial tem melhores resultados quando feita mais cedo.

Os vinhos produzidos por fermentação sequencial e o vinho de controlo com a levedura Y2 apresentaram maior acidez, maior concentração de açúcares residuais e de glicerol, e menor título alcoométrico volúmico.

A estirpe de *S. uvarum* produziu nos vinhos maior quantidade de 2-feniletanol e de acetato de 2-feniletilo. No vinho Y2+Y59(1054) houve a maior acumulação destes compostos de odor a rosas, mas os provadores avaliaram o vinho Y2+Y59(1047) como o mais floral. Nos ensaios de fermentação sequencial, quanto mais tarde foi realizada a inoculação da segunda levedura, menor foi a produção de aromas fermentativos.

Na avaliação que o painel fez de cada vinho, o favorito foi o vinho Controlo Y2, que foi fermentado com *S. uvarum*, uma levedura não convencional. Em seguida as melhores classificações foram dadas aos

vinhos Controlo Y59 (fermentado apenas com *S. cerevisiae*) e Y2+Y59(1047) (produzido por fermentação sequencial).

Todos os resultados apresentados levam à conclusão que a fermentação sequencial com as duas leveduras testadas é viável, e é capaz de produzir vinhos que agradem aos consumidores, com características distintas dos vinhos fermentados com culturas puras de *S. cerevisiae*. Ficou também provado o potencial da estirpe utilizada de *S. uvarum* na produção de vinhos mais doces, com aromas florais e com menor teor alcoólico.

O trabalho realizado e os resultados obtidos foram esclarecedores, por um lado, mas por outro levantaram novas dúvidas. Por exemplo, porque razão os provadores avaliaram melhor o vinho do ensaio Y2+Y59(1047) e o consideraram mais floral, se na verdade o vinho Y2+Y59(1054), que foi inoculado mais cedo, tinha uma maior concentração de compostos de aroma floral. Também é incerta a razão de o vinho produzido por co-inoculação ter sido o menos apelativo, já que se assemelhava muito ao vinho Controlo Y59, que foi dos preferidos pelo painel. Para responder a estas questões com maior certeza seria necessário repetir estes ensaios, garantindo que o mosto utilizado tivesse uma concentração inicial de açúcares mais apropriada. Para experiências futuras propõe-se também tomar cuidado com a conservação das mostras antes da análise, visto que teve influência nos valores medidos de acidez, e também avaliar quais as possíveis causas dos erros associados às análises dos compostos voláteis do aroma, que foram bastante significativos (e cuja causa mais provável foi erro do operador).

Para maior certeza dos resultados conseguidos com as duas leveduras utilizadas em inoculação sequencial, ao repetir a experiência seria importante preparar sempre um inóculo novo de Y59 com menos de 48 h de antecedência, em vez de utilizar sempre o mesmo inóculo para os diferentes ensaios, uma vez que as leveduras podem perder atividade. Também seria interessante completar os resultados dos compostos voláteis do aroma com uma Análise de Componentes Principais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT – Food Science and Technology*, *49*, 8-13.
- Barrajón, N., Capece, A., Arévalo-Villena, M., Briones, A., Romano, P. (2011). Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and influence on volatile composition of wines. *Food Microbiology*, *28*, 1080–1086.
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N., Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation : A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, *25*, 287–293.
- Boidron, J. N., Chatonnet, P., Pons, M. (1988). Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, *22*, 275-294.
- Capece, A., Siesto, G., Romaniello, R., Lagreca, V. M., Pietrafesa, R., Calabretti, A., Romano, P. (2013). Assessment of competition in wine fermentation among wild *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Sangiovese grapes in Tuscany region. *LWT – Food Science and Technology*, *54*, 485-492.
- Chaves, M., Zea, L., Moyano, L., Medina, M. (2007). Changes in color and odorant compounds during oxidative aging of Pedro Ximenez sweet wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 3592-3598.
- Cheraiti, N., Guezenec, S., Salmon, J. (2005). Redox Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in Mixed Culture under Enological Conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 255–260.
- Ciani, M., Beco, L., Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, *108*, 239–245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, *10*, 123-133.
- Ciani, M., Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, *1*, 1–6.
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F. (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *98*, 301–308.
- Comissão das Comunidades Europeias. Regulamento (CE) N.º 607/2009. Jornal Oficial da União Europeia.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, *28*, 873–82.
- Conselho da União Europeia. Regulamento (CE) N.º 491/2009. Jornal Oficial da União Europeia.

- Delanoe, D.; Maillard, C.; Maisondieu, D. (1987). *O vinho – da análise à elaboração*. Portugal: Europa-América.
- Drumonde-Neves, J., Vieira, E., Lima, M. T., Araújo, I., Casal, M., Schuller, D. (2013). An easy, quick and cheap high-throughput method for yeast DNA extraction from microwell plates. *Journal of Microbiological Methods*, *93*, 206–208.
- Escudero, A., Gogorza, B., Melús, M. A., Ortín, N., Cacho, J., Ferreira, V. (2004). Characterization of the Aroma of a Wine from Maccabeo. Key Role Played by Compounds with Low Odor Activity Values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 3516–3524.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *49*, 329–337.
- Fernández-Espinar, M. T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antoine van Leeuwenhoek*, *78*, 87–97.
- Ferreira, V., López, R., Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 1659-1667.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, *86*, 11–22.
- Francis, I. L., Newton, J. L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*, 114–126.
- Genisheva, Z., Macedo, S., Mussatto, S. I., Teixeira, J. A., Oliveira, J. M. (2012). Production of white wine by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on grape pomace. *Journal of the Institute of Brewing*, *118*, 163–173.
- Genisheva, Z., Vilanova, M., Mussatto, S. I., Teixeira, J. A., Oliveira, J. M. (2014). Consecutive alcoholic fermentations of white grape musts with yeasts immobilized on grape skins – Effect of biocatalyst storage and SO₂ concentration on wine characteristics. *LWT – Food Science and Technology*, *59*, 1114–1122.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, *33*, 271–281.
- Guth, H. (1997a). Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3027-3032.
- Guth, H. (1997b) Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3027-3032.
- Hajar, M.D. S., Noorhisham, T.K., Nurina, A. (2012). Short Technical Communication: Yeast identification from domestic ragi for food fermentation by PCR method. *International Food Research Journal*, *19*, 775-777.
- Hernández, L. F., Espinosa, J. C., Fernández-González, M., Briones, A. (2003). β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, *80*, 171–176.

- Howell, K. S., Cozzolino, D., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., Henschke, P. A. (2006). Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, *6*, 91–101.
- International Organization for Standardization (1994). Norma ISO 11035:1994. Sensory analysis — Identification and selection of descriptors for establishing a sensory Profile by a multidimensional approach (1ª Edição).
- Jacobson, J. L. (2006). *Introduction to wine laboratory practices and procedures*. Nova Iorque: Springer.
- King, E. S., Kievit, R. L., Curtin, C., Swiegers, J. H., Pretorius, I. S., Bastian, S. E. P., & Leigh Francis, I. (2010). The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon Blanc wine aroma composition, sensory properties and consumer preference. *Food Chemistry*, *122*, 618–626.
- Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma — A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *21*, 97-129.
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., Suárez-Lepe, J. A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT — Food Science and Technology*, *59*, 915–922.
- Maicas, S., Mateo, J. J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *67*, 322–335.
- Mateos, J. A. R., Pérez-Navado, F., Fernández, M. R. (2006). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*, 151–157.
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E., Carrau, F. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*, *141*, 2513–2521.
- Molina, A. M., Guadalupe, V., Varela, C., Swiegers, J. H., Pretorius, I. S., Agosin, E. (2009). Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. *Food Chemistry*, *117*, 189–195.
- Montrocher, R., Verner, M., Briolay, J., Gautier, C., Marmeisse, R. (1998). Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *48*, 295–303.
- Moreno, J. A., Zea, A., Moyano, L., Medina, M. (2005). Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control*, *16*, 333-338.
- Nguyen, H., Gaillardin, C. (2005). Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species. *FEMS Yeast Research*, *5*, 471–483.
- OIV — International Organisation of Vine and Wine (2011). Resolution OIV-OENO 408-2011: *Molecular tools for identification of Saccharomyces cerevisiae wine yeast and other yeast species related to winemaking*.
- Oliveira, J. M. M. (2000). *Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas Loureiro e Alvarinho*. Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

- Oliveira, J. M., Faria, M., Sá, F., Barros, F., Araújo, I. M. (2006). C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Analytica Chimica Acta*, 563, 300–309.
- Ortiz, M. J., Barraón, N., Baffi, M. A., Arévalo-Villena, M., Briones, A. (2013). Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. *LWT – Food Science and Technology*, 50, 371–377.
- Ough, C.S., Lee, T.H. (1981). Effect of vineyard nitrogen fertilization level on the formation of some fermentation esters. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, 125-127.
- Perrone, B., Giacosa, S., Rolle, L., Coccolin, L., Rantsiou, K. (2013). Investigation of the dominance behavior of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 156–162.
- Peypaud, E. (1989). *Enología Practica – Conocimiento y Elaboracion del Vino* (3ª Edição). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Pham, T., Wimalasena, T., Box, W. G., Koivuranta, K., Storgårds, E., Smart, K. A., Gibson, B. R. (2011). Evaluation of ITS PCR and RFLP for Differentiation and Identification of Brewing Yeast and Brewery “Wild” Yeast Contaminants. *Journal of the Institute of Brewing*, 117, 556-568.
- Pulvirenti, A., Nguyen, H., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S., Zambonelli, C. (2000). *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters*, 192, 191–196.
- Raynal, C., Wardrop, F., Pilet, O., Languet, P., Dumont, A., Ortiz-Julien, A. (2009). An Innovative Tool for the winemaker: Sequential Inoculation with a non-*Saccharomyces* Yeast and a *Saccharomyces cerevisiae* Yeast, 1–16.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., (2000). *Handbook of Enology, Volume 2 – The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., (2006). *Handbook of Enology, Volume 1 – The Microbiology of Wine and Vinifications* (2ª Edição). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Barbagelata, R. J., Barda, N. B., Caballero, A. C. (2010). Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 19–25.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169–180.
- Saberi, S., Cliff, M. A., van Vuuren, H. J. J. (2012). Impact of mixed *S. cerevisiae* strains on the production of volatiles and estimated sensory profiles of Chardonnay wines. *Food Research International*, 48, 725–735.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*, 32, 243–253.
- Sampaio, J. P., Gonçalves, P. (2008). Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2144–2152.

- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S., Casal, M. (2004). Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*, *231*, 19-26.
- Schuller, D. (2009). *Molecular identification and characterization of yeasts*. Manual de Laboratório de Genética e Biotecnologia Molecular, Mestrado em Genética Molecular. Universidade do Minho, Departamento de Biologia.
- Simpson, R. F. (1979). Some important aroma components of white wine. *Food Technology in Australia*, *31*, 516-522.
- Spagna, G., Barbagallo, R. N., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P. (2002). Properties of endogenous β -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology*, *31*, 1030–1035.
- Ugliano, M., Henschke, P. A., Herderich, M. J., Pretorius, I. S. (2007). Nitrogen management is critical for wine flavour and style. *Wine Industry Journal*, *22*, 24-30.
- Vieira, E., Drumonde-Neves, Machado, R., Silva, P., Gomes, A.C., Sousa, S., Ramos, P. T., Alemão, F., Lima, M. T., Araújo, I., Duarte, F. L., Santos, M.A., Casal, M., Schuller, D. (2010). *A coleção de estirpes autóctones de saccharomyces cerevisiae das principais regiões vitivinícolas portuguesas*. 8.º Simpósio de Viticultura do Alentejo, Évora (Comunicação). Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/12036/1/JPG%20EVieira.pdf>
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Masa, A., Oliveira, J. M. (2010). Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. *Microchemical Journal*, *95*, 240–246.
- Villena, M. A., Iranzo, J. F. Ú., Pérez, A. I. B. (2007). β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*, 420–425.

ANEXO I – CURVAS DE CALIBRAÇÃO UTILIZADAS NAS DETERMINAÇÕES POR HPLC

Tabela A1 – Curvas de calibração utilizadas nas determinações por HPLC, com coeficiente de correlação (R^2) e limites de aplicação

Composto	Curva de calibração	R^2	Limites
Glucose	$\frac{A}{\text{mV s}} = (1353 \pm 26) \frac{C_{\text{Gluc}}}{\text{g/L}} - (73.57 \pm 235.17)$	0.9998	0 g/L a 15.1 g/L
Frutose	$\frac{A}{\text{mV s}} = (1313 \pm 21) \frac{C_{\text{Fru}}}{\text{g/L}} - (59.19 \pm 195.52)$	0.9999	0 g/L a 15.4 g/L
Glicerol	$\frac{A}{\text{mV s}} = (1084.9 \pm 16.4) \frac{C_{\text{Gli}}}{\text{g/L}} - (19.95 \pm 92.70)$	0.9999	0 g/L a 9.3 g/L