

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Rita dos Santos Oliveira

**Avaliação da aptidão enológica de 11 estirpes
de *Saccharomyces cerevisiae*
– estudo à escala piloto**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho realizado sob orientação do
Professor José Maria Marques Oliveira
e da
Mestre Isabel Maria Morais Araújo

outubro de 2017

Declaração

Nome: Ana Rita dos Santos Oliveira

Título da dissertação: Avaliação da aptidão enológica de 11 estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* – estudo à escala piloto

Orientadores:

Professor José Maria Marques Oliveira

Mestre Isabel Maria Morais Araújo

Ano de conclusão: 2017

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica – Ramo Tecnologia Química e Alimentar

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

Universidade do Minho, 31/10/2017

Assinatura: _____

Agradecimentos

A realização da presente dissertação não se deu somente pelo meu trabalho, mas também pela contribuição de determinadas pessoas. Destas pessoas fazem parte aquelas que estão presentes na minha vida desde sempre e também aquelas que em algum momento apareceram e a melhoraram. Se fosse possível, gostaria de agradecer individualmente a todos, mas dado serem inúmeras, apenas irei destacar aquelas que sem as quais eu não estaria a escrever estes agradecimentos. Por isso, é com orgulho que deixo os meus agradecimentos:

Aos meus pais e à minha irmã, gostaria de dizer que os amo. Não costumo dizer muitas vezes, por timidez ou vergonha, mas eles são o meu motivo de existir e o motivo de eu ser como sou. Apoiam e amam-me incondicionalmente. Sem eles eu não estaria aqui e nada disto seria possível. Obrigada pelo vosso amor, apoio, motivação, carinho, tempo, dedicação, pelas palavras de apoio nos momentos mais difíceis ... é pouco do muito que tenho para vos agradecer. Sou muito feliz e agradecida por ser vossa filha e irmã. Vão sempre fazer parte do meu coração.

Às minhas amigas, Cristina, Daniela, Diana, Fátima, Filipa, Magda e Marta, gostaria de agradecer por todas as aventuras e diversões vividas. Espero que esta amizade continue no futuro de forma a que vos possa retribuir tudo o que fizeram por mim. Dentro deste grupo, não podia deixar de ressaltar uma pessoa em particular, a Fátima. Sempre esteve comigo nos bons e nos maus momentos. Foi companheira das minhas loucuras e infantilidades, mas foi também parceira dos momentos mais aborrecidos e nas épocas de estudo e de trabalho.

Ao Professor José Maria Oliveira, orientador desta dissertação, gostaria de agradecer a excelente orientação e disponibilidade, assim como na transmissão de conhecimentos, conselhos e elucidações que foram essenciais. Também gostaria de agradecer ao Eng.º Eduardo Coelho, pela disponibilidade e pelos ensinamentos necessários para a análise dos compostos voláteis do aroma dos vinhos.

À Mestre Isabel Araújo e à Eng.ª Eugénia Vieira, gostaria de agradecer a excelente receção e hospitalidade. Receberam-me na empresa de braços abertos e estiveram sempre disponíveis para me orientar e ajudar. O meu profundo agradecimento pela confiança que depositaram em mim, e pela oportunidade que me deram para a realização do estágio curricular conducente a esta dissertação.

Sumário

O trabalho de dissertação teve como principal objetivo avaliar a aptidão enológica de onze estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* previamente selecionadas pela empresa. Os comportamentos fermentativos das estirpes avaliadas foram comparados com a estirpe comercial Lalvin QA23® (Lallemand). As fermentações foram realizadas numa estação piloto, em cubas com uma capacidade máxima de 20 L e com camisas de arrefecimento. Os vinhos brancos obtidos foram submetidos a análises a nível físico-químico e sensorial, que permitiram determinar as leveduras que apresentam potencial comercial.

A vinificação foi acompanhada pela monitorização diária da massa volúmica, da temperatura, e da quantificação dos açúcares e do título alcoométrico volúmico, por FTIR. Foram registadas todas as alterações a nível do aroma e espuma do mosto em fermentação ao longo do tempo. Os diferentes vinhos produzidos foram analisados relativamente ao teor de açúcar (glucose e frutose), de etanol, de glicerol e dos ácidos orgânicos (tartárico, málico, cítrico e succínico) por HPLC. A acidez total, o pH, o título alcoométrico volúmico e a acidez volátil foram avaliados por FTIR. Os compostos voláteis do aroma foram quantificados por cromatografia gasosa.

Concluiu-se que a fermentação conduzida pela estirpe comercial foi a que se mostrou mais viável, produziu vinhos aprovados pelo painel de provadores e apresentou características físico-químicas interessantes. Somente uma estirpe se mostrou concorrente face à estirpe comercial, dado os vinhos produzidos terem uma avaliação, por parte do painel de provadores, bastante próxima, além de possuírem características organolépticas semelhantes. Em contrapartida, uma estirpe foi descartada dado apresentar um defeito a nível sensorial, sendo evidente o cheiro a ovos podres.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica, leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, vinificação.

Abstract

The main objective of this dissertation's work was to evaluate the oenological suitability of eleven strains of *Saccharomyces cerevisiae* previously selected by the company. The fermentative behaviours were compared with the commercial strain Lalvin QA23® (Lallemand). The fermentations were carried out in a pilot station, in fermenters with a maximum capacity of 20 L equipped with a cooling jacket. The obtained white wines were submitted to physical-chemical and sensorial analyses, which allowed to determine the yeasts with commercial potential.

Vinification was accompanied by daily monitoring of densities and temperatures. Also, daily samples were also taken to quantify sugar consumption and alcoholic strength by volume by FTIR. Moreover, all changes in flavour and foaming of the fermenting must over time were recorded. The different produced wines were analysed for sugar (glucose and fructose), ethanol, glycerol and organic acids (tartaric, malic, citric and succinic) quantification using HPLC chromatographic analysis. Total acidity, pH, alcoholic strength by volume and volatile acidity were evaluated by FTIR. Volatile aroma compounds were quantified by gas chromatography.

Hence, was concluded that the fermentation conducted by the commercial strain proved to be the most viable, as it produced wines approved by the panel of tasters and presented interesting physicochemical characteristics. However, only one strain proved to be competing with the commercial strain, since the wines produced had a very equivalent evaluation, by the panel of testers, as well as similar organoleptic characteristics. In contrast, one strain was discarded because of a defect at the sensory level, the smell of rotten eggs.

Keywords: Alcoholic fermentation, yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, vinification.

Índice

Agradecimentos.....	v
Sumário.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	xvii
Capítulo I – Introdução.....	1
1.1 Contexto, enquadramento e motivações do trabalho	1
1.2 Objetivos do trabalho	2
1.3 Apresentação das empresas	3
1.4 Estrutura da Tese	4
Capítulo II – Revisão Bibliográfica.....	5
2.1 Processo de vinificação	5
2.1.1 Fermentação alcoólica	6
2.1.2 Fatores que afetam a fermentação alcoólica	13
2.2 Composição química do vinho	16
2.2.1 Classificação do aroma do vinho.....	32
2.3 O papel das leveduras na vinificação	34
2.3.1 Características da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
2.3.2 Leveduras vínicas não- <i>Saccharomyces</i>	36
2.3.3 Culturas <i>starter</i>	39
2.4 Análises físico-químicas do vinho	40
2.5 Análise Sensorial	42
Capítulo III – Materiais e Métodos.....	45
3.1 Caracterização do mosto	46
3.2 Preparação dos inóculos de leveduras	48
3.3 Ensaio de fermentação alcoólica	49

3.4 Análises Físico-químicas dos vinhos	51
3.4.1 Doseamento de açúcares, ácidos, glicerol e etanol por HPLC	51
3.4.2 Doseamento da acidez total e do pH por FTIR	52
3.4.3 Doseamento dos compostos voláteis por cromatografia gasosa	53
3.5 Análise Sensorial	55
Capítulo IV – Resultados e Discussão.....	59
4.1 Caraterização do mosto usado nas fermentações	59
4.2 Monitorização da Fermentação alcoólica.....	65
4.3 Caraterização físico-química dos vinhos	72
4.3.1 Açúcares fermentescíveis – glucose e frutose	72
4.3.2 Etanol, TAV e Glicerol	73
4.3.3 Acidez Total, Acidez Volátil e pH	75
4.3.4 Ácidos orgânicos	77
4.3.5 Compostos voláteis maioritários do aroma	79
4.3.6 Compostos voláteis minoritários do aroma.....	83
4.4 Caraterização sensorial dos vinhos	88
Capítulo V – Conclusões e Recomendações.....	95
5.1 Principais conclusões	95
5.2 Recomendações para trabalhos futuros	96
Referências Bibliográficas.....	99
Anexos.....	107
A – Resultados da monitorização da fermentação alcoólica	107
B – Retas de calibração – HPLC	110

Índice de Figuras

Figura 1 – Fatores de qualidade organolética dos vinhos.	5
Figura 2 – Gráfico da evolução da concentração de açúcares ($C_{\text{açúcares}}$), título alcoométrico volúmico (TAV) e a evolução da concentração de leveduras viáveis (N) no mosto durante a fermentação.....	8
Figura 3 – Via glicolítica e fermentação alcoólica com acoplamento enzimático das sequências da fermentação.	9
Figura 4 – Respiração e Fermentação Alcoólica.....	10
Figura 5 – Via da fermentação gliceropirúvica.....	11
Figura 6 – Biossíntese de alguns subprodutos.....	13
Figura 7 – Interações entre as leveduras e os compostos das uvas.....	17
Figura 8 – Compostos derivados da fermentação alcoólica, a partir dos açúcares, aminoácidos e do enxofre	17
Figura 9 – Estrutura química do etanol, glicerol e fenol.....	20
Figura 10 – Produção de álcoois superiores pela via catabólica (Reação de Ehrlich).....	22
Figura 11 – Balanço de esterificação do etanol com o ácido acético.	23
Figura 12 – Esqueleto de um composto flavonoide – A – e de um não-flavonoide – B – (tirosol). 25	
Figura 13 – Ionização e libertação de iões de hidrogénio na água, de um ácido orgânico e um ácido carbónico.....	26
Figura 14 – Formação de ácido acético por leveduras. 1 – piruvato descarboxilase, 2 – álcool desidrogenase, 3 – piruvato desidrogenase, 4 – aldeído desidrogenase, 5 – acetil-CoA -hidrolase e 6 – acetil-CoA sintase.	28
Figura 15 – Estação piloto constituída por 12 fermentadores, revestidos com uma camisa de arrefecimento cuja temperatura é controlada por um chiller.....	45
Figura 16 – Dorna de 250 L e a bomba de água utilizados para diluir o mosto para distribuir nas cubas.....	47
Figura 17 – Na esquerda o chiller que controlava as temperaturas das cubas e a imagem da direita o aerómetro mergulhado na proveta com uma amostra de um mosto e fermentação para ler a massa volúmica.....	50
Figura 18 – Sistema de Cromatografia de Líquidos (HPLC), usado para a quantificação da glucose, da frutose, do etanol, do glicerol, do ácido málico, do ácido cítrico, do ácido tartárico e do ácido succínico.....	52

Figura 19 – Equipamento OenoFoss™ acoplado a um computador com o software adequado para a análise das amostras.	53
Figura 20 – Ficha de prova descritiva simplificada para vinhos brancos.	57
Figura 21 – Perfil da variação da massa volúmica (ρ) ao longo do tempo (t), associado ao respetivo erro ($p = 0,05$) – Estirpe Y3.	66
Figura 22 – Variação da concentração de glucose + frutose ($C_{glu+fru}$) e do título alcoométrico volúmico (TAV), quantificado por FTIR, em função do tempo de fermentação (t), associado ao respetivo erro ($p = 0,05$) – Estirpe Y3.	67
Figura 23 – Produção de espuma ao longo da fermentação, relativamente às estirpes Y3, Y5, Y6, Y15 e Y18, onde a imagem 1 representa os primeiros 3 dias, a imagem 2 os dias 4 a 8, e a imagem 3 até ao final da fermentação, destas 5 estirpes.	70
Figura 24 – Produção de espuma ao longo da fermentação, relativamente às estirpes Y4, Y8 e Y10, onde a imagem 1 representa os primeiros 3 dias, a imagem 2 os dias 4 a 6, e a imagem 3 até ao final da fermentação, destas 3 estirpes.	70
Figura 25 – Produção de espuma ao longo da fermentação, relativamente às estirpes Y14 e a Lalvin QA23 (1) e Y12 e Y17 (2).	71
Figura 26 – Diferença da cor do mosto em fermentação no 8.º dia (1) e no 9.º dia (2) de fermentação – Estirpe Y6.	71
Figura 27 – Medianas dos valores obtidos do exame olfativo dos vinhos brancos, pelos 5 provadores	90
Figura 28 – Medianas dos valores obtidos do exame gustativo dos vinhos brancos, pelos 5 provadores	91
Figura A.1 – Perfil da variação da massa volúmica (ρ) e respetivo erro associado ($p = 0,05$), ao longo do tempo de fermentação (t), relativamente a cada estirpe.....	107
Figura A.2 – Variação da concentração de glucose + frutose ($C_{glu+fru}$) e do título alcoométrico volúmico (TAV), quantificados por FTIR, em função do tempo de fermentação (t), associado ao respetivo erro ($p = 0,05$), relativamente a cada estirpe.	108

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Concentrações padrão (C) de algumas substâncias e os seus respetivos limites legais em vinhos brancos..	19
Tabela 2 – Taxa de combinação do SO_2 (t_x) com diversos componentes do vinho.....	31
Tabela 3 – Especificações e resultados descritas no certificado de análise que vinha junto com o mosto concentrado de uvas brancas: <i>Brix</i> , concentração de SO_2 total ($C_{\text{SO}_2, \text{total}}$), pH, acidez total (AT), cor, contagem aeróbia total de unidades formadoras de colónias (CAT) e leveduras e bolores (LB)	46
Tabela 4 – Correlação entre a absorvência média a 620 nm dos inóculos ($Abs_{620 \text{ nm}}$), a concentração celular (n – número de células por unidade de volume) e o volume de suspensão celular (V) de cada estirpe inoculadas em 20 L de mosto	49
Tabela 5 – Valores médios da massa volúmica (ρ) e álcool provável, em volume (AP_{aer}) do mosto contido nos fermentadores onde se inocularam as estirpes indicadas e na dorna, lidos no aerómetro.....	60
Tabela 6 – Valores dos principais parâmetros físico-químicos: sólidos solúveis totais (SST), acidez total (AT), pH, acidez volátil (AV), concentração do azoto amoniacal ($C_{\text{NH}_4^+}$), azoto com grupo alfa-amino (AAN), massa volúmica (ρ), concentração do ácido málico ($C_{\text{Ác. Málico}}$), concentração do ácido tartárico ($C_{\text{Tartárico}}$) e concentração de açúcares ($C_{\text{açúcares}}$), com os respetivos erros associados ($p = 0,05$), obtidos pela análise por FTIR, relativamente ao mosto diluído em cada fermentador (1.ª série)	61
Tabela 7 – Valores dos principais parâmetros físico-químicos: SST , AT , pH, AV , $C_{\text{NH}_4^+}$, AAN , ρ e $C_{\text{açúcares}}$ obtidos pela análise por FTIR; $C_{\text{Ác. Málico}}$, $C_{\text{Ác. Tartárico}}$, $C_{\text{Ác. Cítrico}}$, C_{glucose} e C_{frutose} por HPLC, com os respetivos erros associados ($p = 0,05$), relativamente ao mosto diluído na dorna (2.ª série)	62
Tabela 8 – Concentrações de glucose (C_{glucose}), de frutose (C_{frutose}) e de hexoses (C_{hexoses}), determinados por HPLC, e respetivo erro associado ($p = 0,05$)	73
Tabela 9 – Valores do título alcoométrico volúmico (TAV), determinado por FTIR, e as concentrações de etanol (C_{etanol}) e de glicerol (C_{glicerol}), quantificadas por HPLC, associadas ao respetivo erro ($p = 0,05$)	74

Tabela 10 – Concentrações de acidez total (<i>AT</i>), acidez volátil (<i>AV</i>) e os valores de pH, determinados por FTIR, associados ao respetivo erro ($p = 0,05$)	77
Tabela 11 – Concentração do ácido tartárico ($C_{\text{Ác.Tartárico}}$), do ácido málico ($C_{\text{Ác.Málico}}$), do ácido cítrico ($C_{\text{Ác.Cítrico}}$) e do ácido succínico ($C_{\text{Ác.Succínico}}$), determinado por HPLC, associados ao respetivo erro ($p = 0,05$)	78
Tabela 12 – Concentrações médias (<i>C</i>) dos compostos voláteis maioritários detetados nos vinhos por análise quantitativa por GC-FID, associados aos limiares de perceção olfativa (<i>LPO</i>), com o respetivo desvio-padrão, relativamente a cada estirpe avaliada	81
Tabela 13 – Concentrações médias (<i>C</i>) dos compostos voláteis minoritários de interesse detetados nas amostras dos vinhos por análise semiquantitativa por GC-MS, associados aos respetivos limiares de perceção olfativa (<i>LPO</i>), relativamente a algumas das estirpes avaliadas, com o respetivo desvio-padrão	84
Tabela 14 – Descrição olfativa dos compostos voláteis minoritários detetados e quantificados.....	86
Tabela 15 – Medianas dos valores obtidos do exame visual dos vinhos brancos, pelos 5 provadores	88
Tabela 16 – Medianas dos valores obtidos da impressão geral do exame olfativo dos vinhos brancos, pelos 5 provadores	89
Tabela 17 – Medianas dos valores obtidos da impressão geral do exame gustativo dos vinhos brancos, pelos 5 provadores	90
Tabela 18 – Medianas dos valores obtidos da nota final dos vinhos brancos, pelos 5 provadores	92
Tabela B.1 – Curvas de calibração, que relacionam a área do pico cromatográfico (<i>A</i>) com a concentração (<i>C</i>), com um intervalo de confiança de 95 %, com o respetivo coeficiente de determinação (R^2) e limites usados	110

Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Siglas e Abreviaturas

CVRVV	Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes
FA	Fermentação Alcoólica
FTIR	Espectroscopia por Infravermelhos por Transformada de <i>Fourier</i> , do inglês <i>Fourier Transform InfraRed Spectroscopy</i>
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama – <i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa, do inglês <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IVV	Instituto da Vinha e do Vinho
LSA	Leveduras Secas Ativas
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho, do inglês <i>Internacional Organization of Vine and Wine</i>
YPD	Extrato de Levedura Peptona Dextrose, do inglês <i>Yeast Peptone Dextrose</i>

Variáveis

AP_{aer}	Álcool Provável lido pelo aerómetro
A	Área do pico cromatográfico
AAN	Azoto com grupo alfa-amino, do inglês <i>Alpha Amino Nitrogen</i>
AT	Acidez Total, expressa em ácido tartárico
AV	Acidez Volátil, expressa em ácido acético
C	Concentração média
$C_{\text{açúcares}}$	Concentração de açúcares fermentescíveis
$C_{\text{Ác. Cítrico}}$	Concentração de ácido cítrico
$C_{\text{Ác. Málico}}$	Concentração de ácido málico
$C_{\text{Ác. Succínico}}$	Concentração de ácido succínico
$C_{\text{Ác. Tartárico}}$	Concentração de ácido tartárico
$C_{\text{NH}_4^+}$	Concentração de azoto amoniacal
C_{etanol}	Concentração de etanol
C_{frutose}	Concentração de frutose
C_{glicerol}	Concentração de glicerol
C_{glucose}	Concentração de glucose
$C_{\text{Glu+Fru}}$	Concentração de glucose e frutose
DO	Densidade Ótica
N	Concentração de leveduras viáveis
SST	Sólidos Solúveis Totais
t	Tempo
TAV	Título Alcoométrico Volúmico Adquirido
ρ	Massa Volúmica

Capítulo I – Introdução

1.1 Contexto, enquadramento e motivações do trabalho

A importância da levedura na indústria alimentar e nas bebidas só foi percebida por volta de 1860, quando o seu papel se tornou evidente. No entanto, as leveduras têm sido usadas desde tempos mais antigos, a evidência mais sólida do surgimento do vinho remonta ao período 3000 a.C. a 2000 a.C [1]. As leveduras representam o grupo mais importante de microrganismos para os vinicultores, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a principal levedura responsável pela fermentação alcoólica de mosto de uva durante a vinificação.

A produção de vinhos a partir das uvas é um dos processos biotecnológicos mais antigos do mundo. A fermentação do mosto de uva é um complexo processo bioquímico em que as leveduras transformam os açúcares, presentes nos mostos, em etanol, dióxido de carbono e muitos outros produtos secundários. Assim, a qualidade de um vinho é influenciada por vários fatores, incluindo a levedura utilizada, o mosto e as práticas de vinificação [2].

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 479/2008 [3], o vinho é definido como “o produto obtido exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mostos de uvas. O vinho tem um título alcoométrico volúmico igual ou superior a 9 % e não superior a 15 %”.

Em Portugal, o setor vinícola tem apresentado uma grande relevância, quer a nível económico, social ou até mesmo cultural, conseguindo sempre sobressair-se a nível mundial, sendo dos produtos mais conhecidos e apreciados internacionalmente. O vinho Português é reconhecido pela qualidade e variedade, baseado maioritariamente nas castas autóctones do país, mas também pela relação qualidade-preço. Este reconhecimento internacional valoriza o esforço e dedicação constante dos produtores nacionais, que têm conseguido acompanhar os desenvolvimentos que surgem neste setor, apesar dos aumentos das exigências dos consumidores e da concorrência entre mercados.

O vinho resulta de um processo bastante complexo, cuja qualidade está relacionada não só com o processo de vinificação como também com o solo, com o clima, a casta, as condições de cultivo e a vindima. As reações biológicas e químicas envolvidas no processo e que intervêm na

qualidade do mesmo são variadas, assim como diversos outros fatores que podem influenciar o resultado final, o que explica a complexidade desta bebida [4]. No entanto, as características sensoriais são devidas, na sua maioria, à fermentação alcoólica. Torna-se assim importante controlar e acompanhar bem esta etapa, assim como na escolha da levedura responsável pela fermentação, com o intuito de melhorar o produto final e controlar de forma eficaz a velocidade de reação.

O carácter e a qualidade ímpar dos vinhos portugueses fazem de Portugal uma referência entre os demais países produtores. As exportações de vinho português, para todo o mundo, demonstram o dinamismo do setor vitivinícola, aliado aos muitos séculos de história que envolve as vinhas e o vinho e o seu envolvimento com a económica Portuguesa constituem os principais alicerces da grande motivação que envolve esta área e assim a realização deste estudo.

1.2 Objetivos do trabalho

O vinho pode adquirir diferentes perfis sensoriais e composições químicas em função de diversos fatores, sendo o mais impactante a fermentação alcoólica. Por esse motivo, torna-se vital fazer um acompanhamento desta etapa se se pretender obter um vinho de qualidade. Contudo, antes de se realizar a fermentação, é necessário decidir qual a levedura que se vai usar no processo, dado que cada levedura tem o seu próprio metabolismo que leva à formação de vinhos com características diferentes. A escolha da levedura é, portanto, uma das grandes decisões que é tomada no processo de vinificação.

O trabalho de dissertação descrito na presente tese, teve como objetivo acompanhar a fermentação alcoólica, à escala piloto, de 11 estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* previamente selecionadas pela empresa *Vinalia*, e eleger aquelas que apresentam características enológicas interessantes. As fermentações ocorreram em fermentadores de inox sujeitas às condições gerais de vinificação utilizadas em adega, mantendo-se constante as condições de operação para todas as fermentações, sendo utilizado sempre o mesmo mosto.

Os vinhos brancos obtidos foram submetidos a análises a nível físico-químico e sensorial, que juntamente com as análises do mosto em fermentação, decorrentes do acompanhamento das fermentações, permitiram determinar as leveduras que apresentam potencial comercial.

1.3 Apresentação das empresas

O trabalho experimental descrito na presente tese, foi concretizado na empresa *Yeast Wine – Wine Solutions*, Lda., uma empresa fundada em 2011, que dispõe de uma estação piloto constituída por 12 fermentadores, com temperatura controlada por um *chiller*. A estação permite selecionar leveduras e/ou condições de operação diferentes que apresentam características interessantes no setor dos vinhos, por valorizarem e destacarem o produto final. Assim, a empresa ocupa-se com a identificação e o isolamento de leveduras presentes nas uvas e no mosto destacando aquelas que apresentam características enológicas interessantes. Oferece também serviços como a identificação de leveduras de contaminação, testes à escala piloto e produção de fermentos selecionados [5].

As fermentações, à escala piloto, decorrem assim com as estirpes escolhidas, tendo lugar uma análise enológica e sensorial dos vinhos obtidos. As análises físico-químicas do mosto e do vinho realizadas na empresa englobam a quantificação de etanol, acidez volátil, acidez total, pH, ácido málico, glucose/frutose, densidade e cor. Estas análises permitem monitorizar o processo de vinificação e a qualidade do produto final. As análises sensoriais avaliam a qualidade organolética dos vinhos, sendo realizados por um painel de provadores, que analisam a cor, o aroma e o sabor [5].

As leveduras utilizadas no trabalho experimental foram previamente selecionadas pela empresa *Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura*. A qualidade, inovação, investigação e desenvolvimento são os grandes vetores de atuação desta empresa, oferecendo uma vasta gama de serviços aos produtores de vinhos: consultoria a fim de otimizar a qualidade das uvas, da condução do processo de vinificação e da estabilização e conservação dos vinhos. A *Vinalia* realiza estudos de mercado para conseguir direcionar o seu trabalho de acordo com as necessidades dos clientes. Por último, ressalta-se o facto de a empresa realizar análises sensoriais e físico-químicas para garantir a qualidade e segurança dos vinhos, e análises microbiológicas, que permitem caracterizar as leveduras envolvidas em fermentações espontâneas, identificar leveduras de contaminação e estudar a implantação de estirpes comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* [6].

1.4 Estrutura da Tese

Esta dissertação encontra-se dividida em 5 partes principais, necessárias para facilitar o entendimento do tema por parte do leitor. No primeiro capítulo, Capítulo I – Introdução, o presente capítulo, são apresentados de forma sucinta os principais objetivos e motivações implícitos para a realização do trabalho experimental, assim como uma breve apresentação e enquadramento do tema. Por último, as empresas envolvidas na concretização da atividade experimental, nomeadamente a *Vinalia* e a *Yeast Wine*, foram brevemente apresentadas.

O segundo capítulo, Capítulo II – Revisão Bibliográfica, visa enquadrar o leitor no tema discutido na presente dissertação. Para tal, começa-se por descrever de forma sucinta o processo de vinificação, passando de seguida para uma descrição da etapa “mais importante” do processo, a fermentação alcoólica. Nesse ponto o processo é descrito, envolvendo alguns parâmetros que o influenciam, nomeadamente a temperatura, o pH, os nutrientes e o oxigénio. É feita uma revisão bibliográfica sobre alguns dos compostos presentes na composição final do vinho, descrevendo de forma resumida o seu contributo para o perfil sensorial; o papel das leveduras na vinificação, dando ênfase às leveduras secas ativas; a classificação do aroma do vinho; e é apresentada uma breve descrição do que é a análise sensorial.

No terceiro capítulo, Capítulo III – Materiais e Métodos, são descritas pormenorizadamente todas as metodologias utilizadas para a concretização do trabalho prático, nomeadamente para a caracterização do mosto utilizado na fermentação alcoólica, a preparação do pré-inóculo e do inóculo de levedura, o acompanhamento das fermentações, a recolha de amostras e respetivas análises físico-químicas e sensoriais.

No quarto capítulo, Capítulo IV – Resultados e Discussão, tal como o título indica, são apresentados os resultados obtidos com a respetiva discussão, sendo comparados com outros dados publicados sempre que tal foi possível. A discussão envolve a caracterização do mosto, o comportamento fermentativo das estirpes, as análises físico-químicas e sensoriais dos vinhos obtidos.

Finalmente, no quinto e último capítulo, Capítulo V – Conclusões e Recomendações, são apresentadas as principais conclusões de todo o trabalho, assim como algumas sugestões possíveis de adotar em futuros trabalhos semelhantes ao apresentado.

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

2.1 Processo de vinificação

O objetivo do viticultor será produzir uvas com a melhor qualidade possível, já que quanto melhor for a sua qualidade melhor a será qualidade do vinho, em princípio. A casta, a região de produção, as práticas agrícolas e o ciclo de crescimento e desenvolvimento da uva, desempenham um papel muito importante na qualidade da mesma e conseqüentemente na produção do vinho [4]. O vinicultor, com uvas de boa qualidade, controlo do processo de vinificação e boas práticas de produção de vinho terá tudo para obter um vinho de boa qualidade (Figura 1).

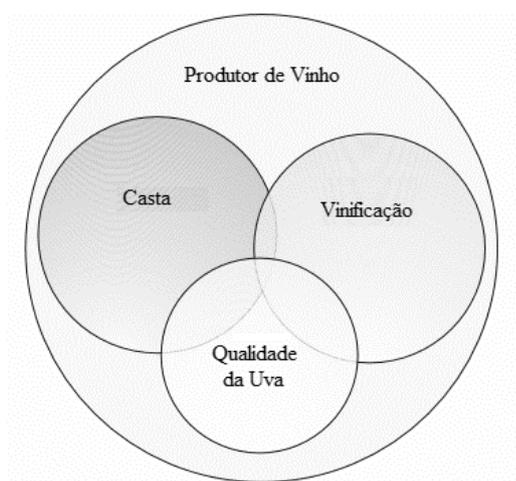


Figura 1 – Fatores de qualidade organolética dos vinhos. Adaptado de Jackson [7].

Todas as etapas do processo de vinificação são importantes para o desenvolvimento das características finais do produto, contudo a fase que tem maior peso no que diz respeito à qualidade química, física e sensorial do vinho, são as fermentações – alcoólica e malolática. Dada a importância, e por envolverem o recurso de microrganismos, é crucial controlar e vigiar estas duas etapas, para se obter o produto desejado e fazer as alterações atempadamente aquando da ocorrência de problemas [8].

A fermentação do mosto para a produção de vinho é um processo complexo que envolve a interação de muitas espécies microbianas, representadas por leveduras, bactérias ácido lácticas e bactérias acéticas. A fermentação alcoólica é obrigatória e, portanto, comum a todos os vinhos, sendo realizada por leveduras. Relativamente à vinificação, somente alguns géneros de leveduras

estão associados ao processo, nomeadamente: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, e *Zygosaccharomyces* [9,10]. A fermentação malolática, pela atuação de bactérias ácido lácticas, é o processo metabólico de degradação do ácido L-málico (ácido dicarboxílico) em ácido L-lático (ácido monocarboxílico) e CO₂, sendo responsável pela diminuição da acidez total e modificação do perfil sensorial [11]. Apenas 4 géneros de bactérias ácido lácticas estão associados ao processo de vinificação: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus*. Na maioria dos casos, a espécie dominante nesta fermentação é a *Oenococcus oeni* [9,12].

Em processos de vinificação, geralmente só os vinhos tintos beneficiam da fermentação malolática. Esta fermentação, ocorre geralmente, em regiões climatéricas mais frias ou onde a redução de acidez melhora as características gustativas do vinho. No caso do vinho branco, a retenção da acidez contribuiu para o seu sabor fresco. O seu desenvolvimento é impedido pela adição de dióxido de enxofre, clarificação e armazenamento a baixas temperaturas [4].

As vias metabólicas dos diferentes microrganismos a atuar no mosto, são os principais responsáveis pela formação de aromas e sabores, geralmente contribuindo beneficemente para a qualidade final do vinho. Contudo, uma proliferação descontrolada de leveduras ou de bactérias pode levar ao aparecimento de alguns componentes indesejados, que quando presentes em determinadas concentrações possuem impacto sensorial [9]. Na atividade experimental descrita na presente dissertação produziu-se vinho branco, pelo que somente se refere sumariamente a fermentação alcoólica.

2.1.1 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica ocorre por ação de leveduras e consiste na degradação anaeróbia dos açúcares do mosto – glucose e frutose – em etanol (CH₃CH₂OH) e dióxido de carbono (CO₂), como produtos principais, mas também são produzidos outros produtos secundários, como o glicerol, álcoois superiores, ácido acético, ácido succínico, ácidos gordos, ésteres, aldeídos, sulfuretos orgânicos, entre outros [13]. A presença e a concentração destes produtos secundários varia diretamente com a estirpe de levedura, a maturação da uva, as castas presentes no mosto, a higiene e boas práticas de produção e as condições de operação da fermentação (*e.g.* arejamento,

temperatura e nutrientes). Esta rica variedade de componentes, que difere de vinho para vinho, é que torna esta bebida muito complexa e interessante [14].

Os microrganismos capazes de fermentar o mosto encontram-se naturalmente presentes na uva, apesar de a sua concentração e variedade depender de fatores geográficos, climáticos, estado do fruto e adição de produtos fitossanitários. No início da fermentação poderão estar fortemente presentes leveduras do género *Candida* e *Kluyveromyces*, contudo no final da fermentação a *Saccharomyces cerevisiae* é a única espécie presente por apresentar resistência ao elevado teor de etanol. No entanto, este tipo fermentação espontânea tem uma fase de arranque lenta, apesar de as leveduras estarem presentes no mosto, o seu número inicial é muito reduzido, pelo que é preciso tempo para a sua multiplicação [8]. Os vinicultores sempre estiveram interessados em melhorar a cinética de fermentação e a qualidade do vinho. Por este motivo é vantajoso adicionar ao mosto um inóculo preparado a partir de leveduras secas ativas, desta forma, tornar a concentração celular inicial mais elevada para que o processo seja acelerado [15].

Durante a fermentação alcoólica ocorrem essencialmente três fenómenos. Após a inoculação da levedura, esta transforma os açúcares da uva – glucose e frutose – em ácido pirúvico, fenómeno denominado glicólise. Seguidamente, ocorre a descarboxilação do ácido pirúvico em acetaldeído que é reduzido a etanol (normalmente não excede os 15 % vol.) [8]. Um gráfico padrão da variação do teor de etanol, da concentração de açúcares e células viáveis ao longo da fermentação pode ser analisado na Figura 2. Contudo, a composição química das uvas (que varia de ano para ano) bem como as condições físicas da fermentação (como a temperatura e o pH) alteram a atividade metabólica da levedura, conduzindo a alterações no vinho [7].

As leveduras são as responsáveis pelas transformações bioquímicas que ocorrem na fermentação, em particular a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a mais evidente a transformação dos açúcares do mosto em etanol. Contudo, dependendo da presença de oxigénio e de outros fatores, a *Saccharomyces cerevisiae* pode degradar os açúcares do mosto utilizando três vias: respiração, fermentação alcoólica, fermentação gliceropirúvica [15].

As três vias iniciam-se de modo semelhante: na glicólise, dá-se a transformação das hexoses presentes nas uvas em ácido pirúvico. Na presença de oxigénio, as leveduras usam preferencialmente a via respiratória. Entretanto, num meio com altas concentrações de açúcares, mesmo na presença de oxigénio, a *S. cerevisiae* opta pela via fermentativa (efeito *Crabtree*) [16]. A levedura *S. cerevisiae* é considerada *Crabtree* positiva. O efeito *Crabtree* é definido como uma

fermentação alcoólica que ocorre em condições aeróbias, e uma levedura é considerada como *Crabtree* positiva se o seu metabolismo oxidativo for reprimido por altas concentrações de glucose no meio de cultura [17]. Assim, na ausência de oxigénio e/ou de altas concentrações de açúcar, a levedura direciona o ácido pirúvico para a produção de etanol – fermentação alcoólica. No caso da *Saccharomyces cerevisiae* deve haver pelo menos 9 g/L de açúcar para que ocorra o efeito *Crabtree* [15]. A Figura 3 mostra o metabolismo das hexoses presentes no mosto de uva por fermentação alcoólica.

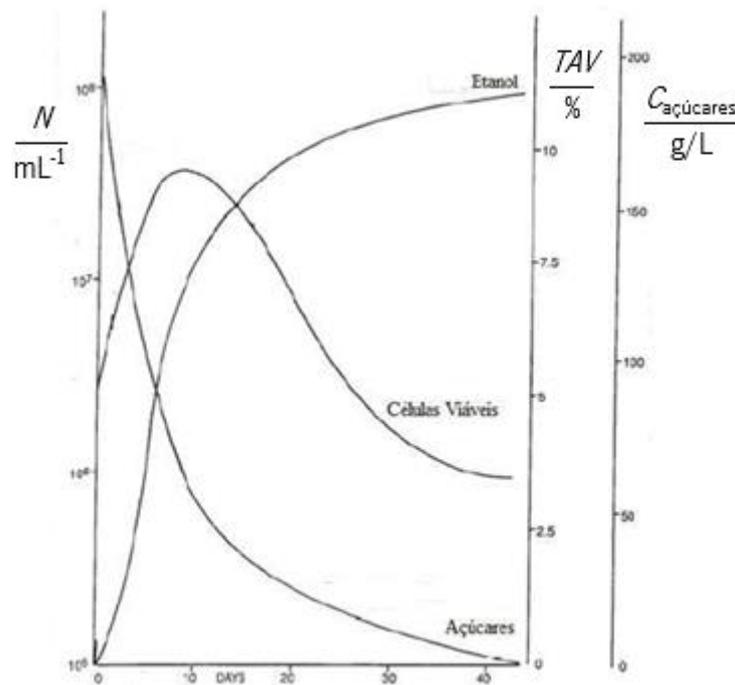


Figura 2 – Gráfico da evolução da concentração de açúcares ($C_{\text{açúcares}}$), título alcoométrico volúmico (TAV) e a evolução da concentração de leveduras viáveis (N) no mosto durante a fermentação. Adaptado de Jackson [7].

Qualquer que seja a hexose esterificada, forma-se a frutose-1,6-difosfato. A quebra da frutose-1,6-difosfato vai conduzir à formação de dois isómeros em proporções diferentes: 96,5 % de dihidroxiacetona-fosfato e 3,5 % de gliceraldeído-3-fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato sofre uma desidrogenação seguida de uma oxidação, através da atuação da nicotinamida adenina dinucleotídeo, que passa da forma oxidada NAD^+ à forma reduzida $\text{NADH} + \text{H}^+$, originando o ácido 1,3-difosfoglicérico. De seguida, este novo composto sofre uma série de reações até se obter o ácido pirúvico; este ao perder uma molécula de dióxido de carbono (descarboxilação), dá origem ao acetaldeído. A molécula do acetaldeído ao fixar um hidrogénio transforma-se em etanol

(redução do acetaldeído). É a forma reduzida da nicotinamida que, ao oxidar-se, fornece o hidrogénio necessário e o NAD^+ é regenerado [18].

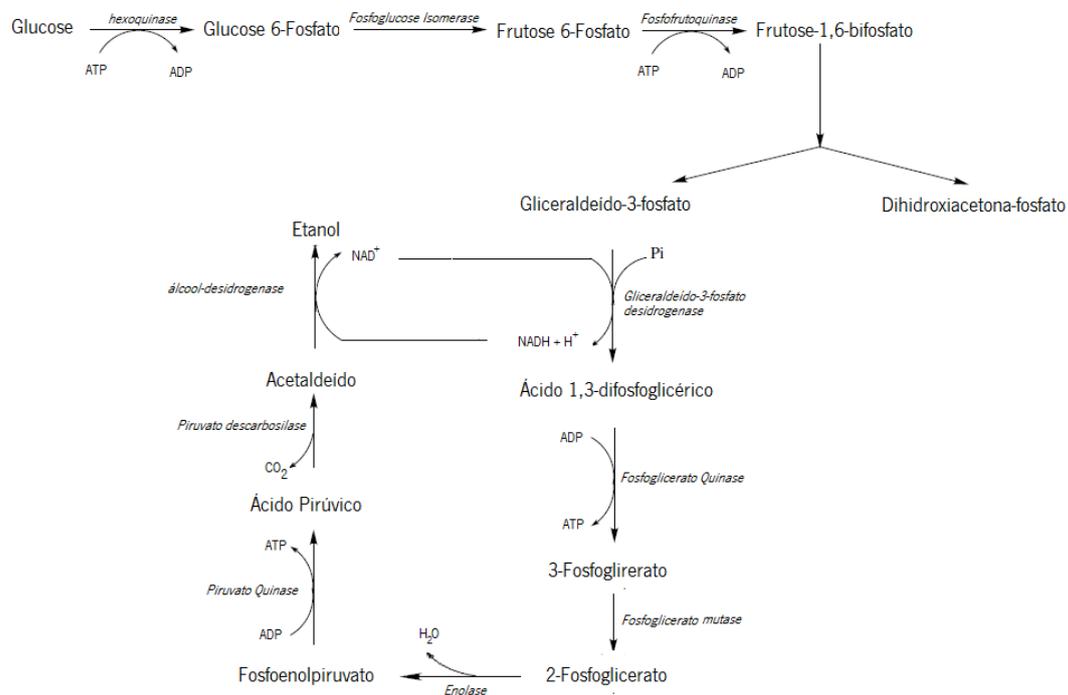
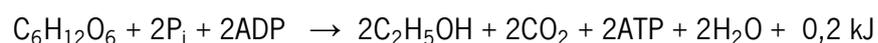


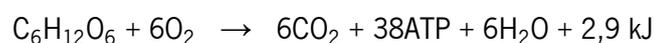
Figura 3 – Via glicolítica e fermentação alcoólica com acoplamento enzimático das sequências da fermentação. Adaptado de Ribéreau-Gayon [15].

Na ausência de oxigénio ou na presença de uma elevada concentração de açúcares no mosto, há uma tendência para a atuação de enzimas específicas (piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase), produzindo etanol e CO_2 a partir do ácido pirúvico. A equação de Gay-Lussac faz o balanço desta etapa. Contudo, na presença de oxigénio, há um deslocamento de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs [19].

Equação de Gay-Lussac:



Ciclo de Krebs:



Quando as hexoses são utilizadas pela via respiratória, o ácido pirúvico sofre descarboxilação oxidativa na presença da coenzima-A e NAD^+ , gerando CO_2 , $\text{NADH} + \text{H}^+$ e acetil-CoA [15]. A Figura 4 mostra o processo em pormenor.

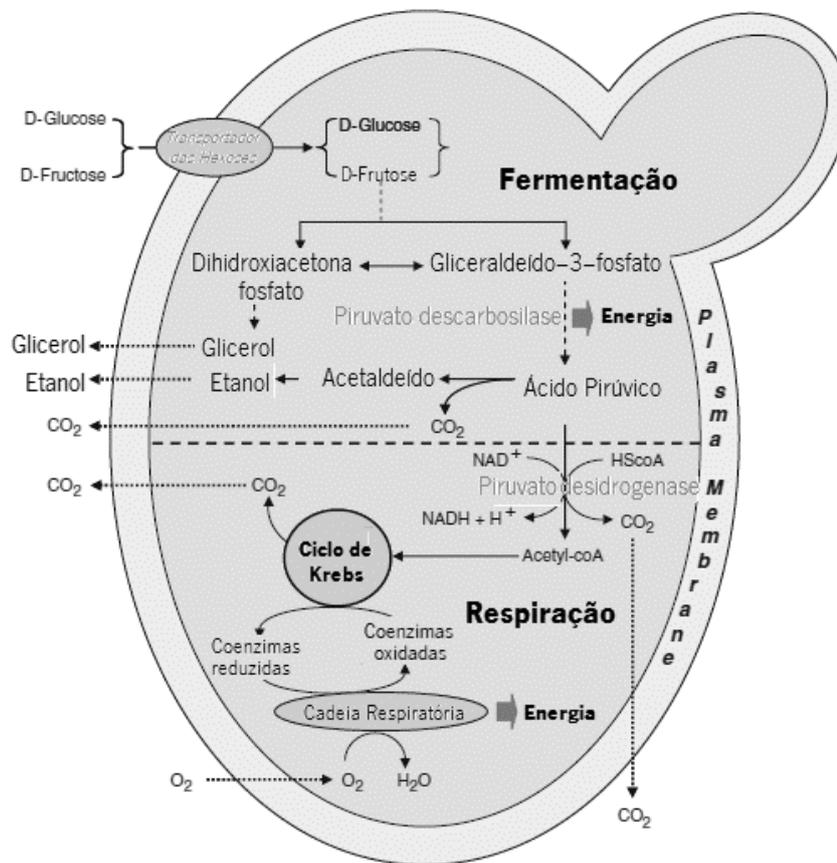


Figura 4 – Respiração e Fermentação Alcoólica. Adaptado de Moreno-Arribas [20].

A fermentação gliceropirúvica ocorre na presença de grandes concentrações de sulfitos. Quando estes compostos se combinam com o acetaldeído, este não pode ser reduzido a etanol, e a dihidroxiacetona-fosfato torna-se o aceitador final de elétrons, sendo posteriormente desfosforilada a glicérol. Esta fermentação tem um ganho de ATP nulo, pelo que não fornece energia biologicamente assimilável pelas leveduras [15]. Esta fermentação não ocorre exclusivamente em ambientes com grandes concentrações de sulfitos, pode ocorrer também no início da fermentação alcoólica do mosto de uva. O inóculo da levedura está a adaptar-se ao meio, na presença de oxigénio, e a multiplicar-se, existindo consumo de açúcares e obtenção de ácido pirúvico. Contudo, parte deste segue outra via metabólica e é transformado noutros produtos metabólicos, como o diacetilo, a acetoina e o 2,3-butanodiol, compostos que conferem um aroma amanteigado ao vinho [16]. Desta fermentação também pode resultar a formação de glicérol.

A fermentação gliceropirúvica ocorre paralelamente à fermentação alcoólica, daí que o glicerol esteja presente numa quantidade significativa no produto final. A sua presença confere suavidade e doçura ao vinho. Além do etanol e do glicerol, durante a fermentação são formados outros compostos, como o ácido acético. Todos estes compostos intervêm nas modificações físico-químicas do meio e tendo em conta o baixo teor de açúcares no final da fermentação, provocam uma diminuição do número de células viáveis e minimizam o risco de posteriores contaminações [7]. A Figura 5 mostra o metabolismo das hexoses presentes no mosto de uva por fermentação gliceropirúvica.

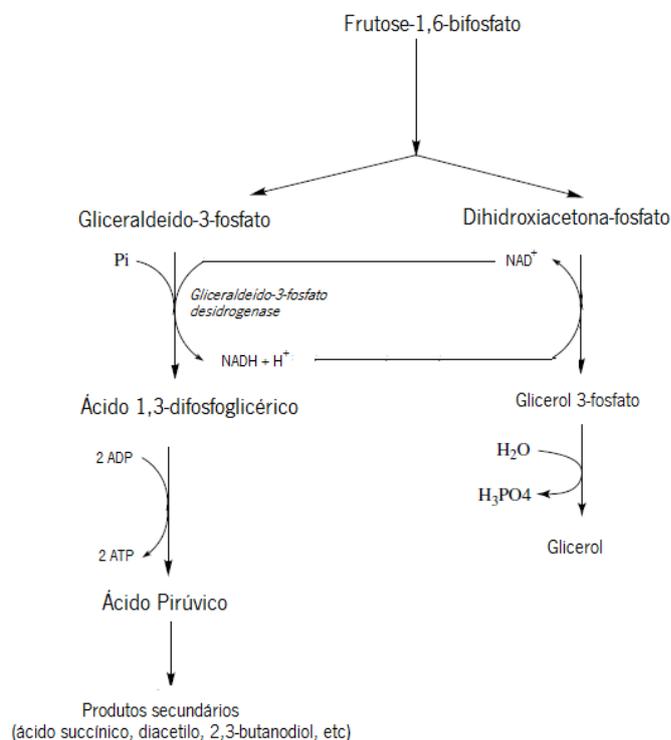


Figura 5 – Via da fermentação gliceropirúvica. Adaptado de Ribéreau-Gayon [15].

A transformação das hexoses em etanol inclui uma desidrogenação e oxidação de gliceraldeído-3-fosfato. É a nicotinamida que permite as trocas de hidrogénio, passando sucessivamente sob as suas duas formas: oxidada, NAD⁺, ou reduzida NADH + H⁺. No início da fermentação não existe acetaldeído para a regeneração do NADH + H⁺ em NAD⁺ oxidado. Assim, no início da fermentação é a dihidroxiacetona-fosfato que permite a regeneração do NAD ao receber o hidrogénio do NADH. Transforma-se então em glicerol-3-fosfato e depois em glicerol. De facto, cada vez que a molécula NADH + H⁺ for reoxidada a NAD⁺ pela dihidroxiacetona-fosfato, forma-se glicerol. Por sua vez, as moléculas de ácido pirúvico dão outros compostos secundários.

Assim, no início a fermentação alcoólica e a fermentação gliceropirúvica ocorrem em simultâneo, sendo esta última a dominante. Ao longo do processo, a fermentação alcoólica adquire maior importância e a fermentação gliceropirúvica atenua sem nunca parar completamente [18].

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza preferencialmente os açúcares presentes no mosto relativamente a qualquer outra fonte de carbono. A glucose não é somente uma fonte de carbono, age também como um regulador global do mecanismo de crescimento celular. Por esse motivo, durante a fermentação alcoólica, quando a concentração de glucose diminuiu e se torna limitante a concentração de células viáveis começa a diminuir [21].

A levedura, para além das fontes de energia e de carbono, supridas pelo metabolismo dos açúcares, também necessita de uma fonte de azoto. Devem-se considerar as fontes de carbono e de azoto como os nutrientes responsáveis pelo crescimento celular [22]. A levedura *S. cerevisiae* tem a capacidade de sintetizar uma grande variedade de compostos capazes de servir de fonte de azoto, tais como aminoácidos, bases azotadas e outras moléculas que contêm azoto. Dessa forma, durante a fermentação alcoólica irão ser gerados muito produtos do catabolismo e de anabolismo dos compostos azotados, entre os quais alguns álcoois superiores e ésteres [23]. Esta variedade de produtos secundários e as suas respetivas concentrações são os responsáveis pela diferenciação dos vinhos, tornando a bebida agradável e complexa ao mesmo tempo.

Como já referido, a fermentação produz principalmente etanol e glicerol, mas também outras substâncias que contribuem para a complexidade do vinho. A Figura 6 mostra esquematicamente a origem metabólica de alguns dos subprodutos mais importante da fermentação alcoólica.

A partir de um inóculo inicial, numa concentração celular de 10^6 mL^{-1} , durante a fase de crescimento multiplicam-se durante 6 ou 7 gerações, sendo obtida uma população máxima de aproximadamente $120 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ a $130 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ [24]. Em geral, um inóculo inicial com uma concentração celular de 10^6 mL^{-1} , é considerado adequado para se obter uma boa cinética de fermentação, sendo que a fermentação é facilmente iniciada no mosto de uva [15]. Contudo, numa fase mais tardia da fermentação, as leveduras entram em declínio metabólico e a maior parte da população acaba por morrer, devido essencialmente a limitações nutricionais e ao acúmulo de componentes tóxicos. Todavia, em certas situações, a fermentação pode tornar-se muito lenta, ou até mesmo parar – amuo e paragem de fermentação. Este fenómeno pode ocorrer devido à uma elevada concentração de açúcares ou de etanol, processo a atuar a uma

Temperatura

A temperatura é um fator que afeta bastante a levedura, dado que exerce efeito sobre a fermentação alcoólica, o crescimento, a viabilidade e o metabolismo [19]. No caso dos vinhos brancos, a temperatura deve encontrar-se, segundo Jackson, na gama 15 °C a 20 °C [4]. A fermentação alcoólica é um processo exotérmico, para cada 17 g/L de açúcar convertido haverá um aumento de aproximadamente 1 °C. Por isso, é recomendado acompanhar a temperatura ao longo da fermentação e dispor de métodos de arrefecimento do tanque. Além disso, garantir que a fermentação se encontra na faixa recomendada, permite um maior rendimento em etanol e na formação de componentes aromáticos, interferindo na qualidade sensorial [27].

Ao operar a temperaturas mais baixas (até 15 °C), ocorre a produção de vinhos brancos mais frutados devido à maior formação de ésteres, vinhos mais ricos em dióxido de carbono, maior rendimento de etanol, menor perda de aromas de origem varietal, menor quantidade de glicerol e menor formação de ácidos voláteis [25,27]. Ao elevar a temperatura obtém-se um grau alcoólico menor e o início da fermentação é mais rápido [28]. Contudo, este aumento não afeta somente a cinética da fermentação, mas também o metabolismo da levedura, que determina a composição final do vinho. Neste caso, a levedura *S. cerevisiae* apresenta uma diminuição da tolerância ao etanol e tem maior dificuldade em assimilar os compostos azotados [19,25]. Além disso, temperaturas extremas podem causar a morte celular [4].

Uma temperatura entre 13 °C e 27 °C, e mostos com um teor alcoométrico volúmico provável de 11 %, representa a melhor faixa de resistência ao etanol para estirpes usuais de *S. cerevisiae*. Essa tolerância diminui para temperaturas inferiores a 13 °C e superiores a 27 °C [29].

Oxigénio

Na presença de grandes concentrações de oxigénio, a fermentação alcoólica é inibida, pelo denominado “Efeito *Pasteur*”. O consumo de açúcares, com arejamento, induz um aumento na biomassa e uma diminuição na produção de etanol [15]. Com arejamento, duas enzimas competem pelo ácido pirúvico, nomeadamente, a enzima piruvato-descarboxilase que está envolvida na via fermentativa, e a enzima piruvato-desidrogenase na respiração celular. Esta competição explica a inibição da fermentação, dado que a enzima piruvato-descarboxilase tem uma afinidade mais baixa para o piruvato do que a enzima piruvato-desidrogenase. Para além da

afinidade para com o piruvato, a fosforilação oxidativa consome uma grande quantidade de ADP e fosfato inorgânico, que migram para as mitocôndrias. Existe assim um déficit de ADP e fosfato inorgânico no citoplasma, que retarda a glicólise. Esta inibição das enzimas e déficit de ADP é que explica a maior parte do efeito *Pasteur* [15]. Contudo, a levedura *S. cerevisiae* é considerada *Crabtree* positiva, ou seja, num meio com altas concentrações de açúcares, mesmo na presença de oxigénio, a *S. cerevisiae* opta pela via fermentativa (efeito *Crabtree*) [16].

O uso de condições de micro-aeração permite aumentar a tolerância da levedura ao etanol e aumentar a utilização do substrato, sem que haja um decréscimo significativo no rendimento em etanol por unidade de substrato consumido [19]. As leveduras necessitam de oxigénio para sintetizar os esteróis e para a assimilação dos ácidos gordos de cadeia longa, estes são considerados fatores de sobrevivência, ou seja, possuem ação sobre a atividade da levedura e sobre a fermentação. Em condições de anaerobiose as leveduras não têm condições para sintetizar estes compostos [30]. A ausência de oxigénio aumenta a probabilidade de formação de sulfureto de hidrogénio (H₂S) [4].

pH

O pH tem grande importância nas fermentações dado que atua a nível do controlo da contaminação bacteriana, taxa de fermentação, formação de subprodutos e sobre o crescimento da levedura [19].

O pH do mosto e do vinho depende diretamente do tipo e concentração de ácidos orgânicos presentes, e da concentração de cations (especialmente potássio) [8]. Geralmente, o pH encontrado no vinho varia entre 2,8 e 3,8 e o pH do mosto encontra-se entre 2,8 e 3,5 [4,15,31]. O seu valor ótimo para a produção de etanol por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* situa-se na faixa de 4 a 5. Contudo, as leveduras mantêm uma homeostase de forma quase independente dos valores do pH do meio, tolerando o meio ácido. O pH interno da célula mantém-se entre 5,8 e 6,9, seja qual for o pH extracelular entre 2 a 7 [19]. Apenas para valores muito baixos (< 3,0) a fermentação pode ser impedida [32], dado que a levedura terá de despende muita energia para a manutenção do pH interno.

Assim, a gama do pH encontrada no mosto tem pouco efeito na velocidade de fermentação ou na síntese e libertação de compostos aromáticos pelas leveduras [4].

Necessidades nutricionais

A composição química das leveduras é muito variável, e evidentemente que muda consoante a espécie e o meio em que vive. Geralmente, uma levedura é composta por 75 % de água e 25 % de matéria seca. Esta, é repartida por glícidos, entre 25 % e 40 %, proteínas de 2 % a 5 %, lípidos de 2 % a 5 % e substâncias minerais (essencialmente ácido fosfórico e potássio) [18]. Assim como indica a sua composição, as leveduras necessitam destes compostos para sobreviverem. Além dos mencionados, as leveduras necessitam ainda de outras substâncias indispensáveis para o seu metabolismo, como as vitaminas (biotina, tiamina, riboflavina, nicotinamida) e compostos azotados. Estes compostos apesar de atuarem em baixas concentrações são indispensáveis para o metabolismo das leveduras [30].

O mosto de uva, em condições normais, é altamente fermentescível, e contém todas as substâncias para assegurar o metabolismo e as funções vitais das leveduras [18]. O mosto contém hidratos de carbono (glucose e frutose) usados como fonte de energia e carbono, ácidos orgânicos (tartárico, málico e cítrico) e sais minerais (fosfato, sulfato, magnésio, cálcio, potássio) que garantem um pH adequado. O mosto contém ainda vitaminas e compostos azotados, que podem estar em diferentes formas: polipéptidos, proteínas, aminoácidos e azoto amoniacal. Ainda é rico noutros constituintes, como os compostos fenólicos que, apesar de não desempenharem um papel fundamental na fermentação, contribuem para a qualidade organolética do vinho [15].

No mosto pode-se considerar a existência de três grupos funcionais, nutrientes, precursores de aroma e compostos ativos não-precusores. A ação das leveduras em muitos destes compostos resulta na complexa variabilidade química do vinho, atuando a nível da aparência, aroma, sabor e sensação da boca (Figura 7) [33].

2.2 Composição química do vinho

A composição química dos vinhos é determinada pela composição das uvas, pelo processo de vinificação e armazenamento. A composição da uva por sua vez, depende de fatores genéticos (casta), ambientais (condições climáticas, tipo de solo, topografia do terreno) e culturais (adubação, poda, práticas de manutenção do vinhedo) [34].

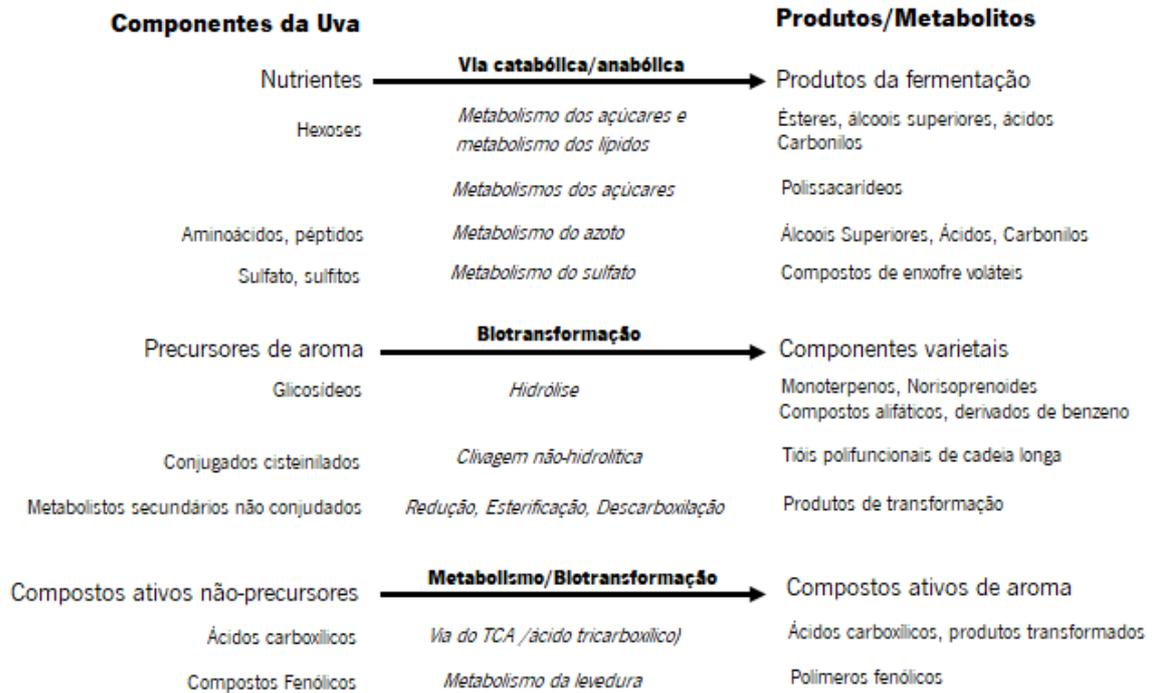


Figura 7 – Interações entre as leveduras e os compostos das uvas. Adaptado de Moreno-Arribas [20].

Durante a fermentação alcoólica os principais compostos formados são o etanol e o glicerol, mas são formados outros compostos em quantidades mais reduzidas, que contribuem para o aroma global do vinho, como os álcoois superiores, ácidos orgânicos, ésteres e aldeídos. Contudo, também são formados compostos indesejáveis, como ácido sulfídrico e sulfuretos orgânicos (Figura 8) [35].

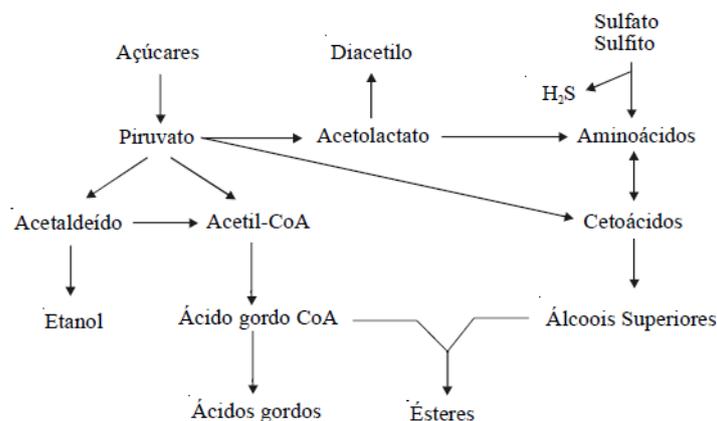


Figura 8 – Compostos derivados da fermentação alcoólica, a partir dos açúcares, aminoácidos e enxofre. Retirada de Oliveira [35].

A composição do vinho é muito complexa, dado que a composição de certos componentes, bem como as respetivas concentrações variam devido a inúmeras razões, como a variedade da uva e a sua qualidade, a data de vindima, condições de recolha, modo de vinificação, modo de conservação e idade do vinho. Estas variações irão descrever diferentes perfis sensoriais e implicações na estabilidade química do vinho. A Tabela 1 apresenta os limites legais de alguns constituintes do vinho. Para além dos componentes descritos na Tabela 1 o vinho pode ser possuidor de muitos outros componentes.

Água

O constituinte maioritário do vinho é a água, que também é o componente mais representativo nas uvas. É essencial para as reações químicas responsáveis pelo crescimento das uvas, para a fermentação e é também importante para a solubilidade dos outros constituintes, dado que só os componentes que estão de forma total ou parcialmente solúveis em água, é que são significativos para a composição do vinho [4,7].

Açúcares

A concentração final dos açúcares varia mediante o estilo de vinho pretendido, podendo ser classificado como doce, meio-doce, adomado ou seco, segundo o Regulamento (CE) N.º 607/2009 [36]. O tipo de vinho desejado tem de ser pensado com antecedência, no sentido em que a casta e o estado de maturação das uvas conduz a variações na concentração de açúcares na uva, e conseqüentemente no mosto [7].

A glucose e a frutose são fundamentais para o crescimento e metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, dado que esta tem capacidades limitadas para fermentar outras substâncias. Apesar de a glucose e a frutose estarem em maior quantidade no mosto, estão presentes, em valor residual, outros açúcares como as pentoses xilose e arabinose, que não são fermentescíveis. Do metabolismo da glucose e da frutose são formados etanol e glicerol, principalmente, havendo também a formação de outros componentes em menores quantidades, mas com uma importante função no vinho [35].

No caso dos vinhos secos, a concentração de açúcar residual é, geralmente, insuficiente para constituir uma ameaça microbiana do vinho engarrafado. Contudo, em concentrações mais

elevadas, os açúcares residuais representam risco de ataque microbiano. Isto é particularmente marcado nos vinhos doces, com baixos níveis de etanol e de acidez [7].

Tabela 1 – Concentrações padrão (*C*) de algumas substâncias e os seus respetivos limites legais em vinhos brancos. Adaptado de *WV* [8,37].

	Constituintes	<i>C</i> / (g/L)	Observações
Gases dissolvido	CO ₂	0,2 a 0,7 (a 20 °C)	Maior teor nos vinhos jovens, limite legal ≤ 3 g/L
	SO ₂ Total	0,08 a 0,2	Se teor de açúcar ≥ 5 g/L o limite é de 0,25 g/L Se teor de açúcar < 5 g/L o limite é de 0,2 g/L
	SO ₂ Livre	0,01 a 0,05	-
Produtos Voláteis	Água	700 a 900	-
	Etanol	8,5 a 15	Expresso em % volúmica
	Álcoois Superiores	0,15 a 0,5	-
	Acetaldeído	0,005 a 0,5	O teor depende do modo de vinificação
	Ésteres	0,5 a 1,5	-
	Acidez Volátil	0,3 a 0,5	Expresso em ácido acético; limite legal ≤ 1,08 g/L
Produtos Fixos	Açúcares	0,8 a 180	Depende do tipo de vinho pretendido
	Glicerol	5 a 12	-
	Taninos e matérias corantes	0,4 a 4	-
	Gomas e matérias pécicas	1 a 3	Segundo o tipo de vindima
Ácidos Orgânicos	Ácido Tartárico	5 a 10	Depende da origem da uva
	Ácido Málico	0 a 1	Depende da fermentação, com ou sem FML
	Ácido Láctico	0,2 a 1,2	FML
	Ácido Cítrico	0 a 0,5	Limite legal ≤ 1 g/L
	Ácido Succínico	0,5 a 1,5	-
Ácidos Minerais	Sulfatos	0,1 a 0,4 (expresso em sulfato de potássio)	Limite legal ≤ 2 g/L
	Cloretos	0,02 a 0,25 (expresso como cloreto de sódio)	≤ 1 g/L
	Fosfatos	0,08 a 0,5	-
Metais	Potássio	0,7 a 1,5	-
	Cálcio	0,06 a 0,09	-
	Cobre	0,0001 a 0,003	Limite legal ≤ 1 mg/L

Álcoois

Os álcoois são compostos orgânicos que contêm um ou mais grupos hidroxilo (OH). Os álcoois simples, como o etanol, contêm um único grupo hidroxilo, enquanto os dióis e polióis contêm dois ou mais grupos hidroxilo, respetivamente. Relativamente aos fenóis, estes são

constituídos por seis átomos de carbono que contêm um ou mais grupos hidroxilo no anel fenilo. Contudo, a sua química é suficientemente distinta pelo que são tratados separadamente [7] (Figura 9).

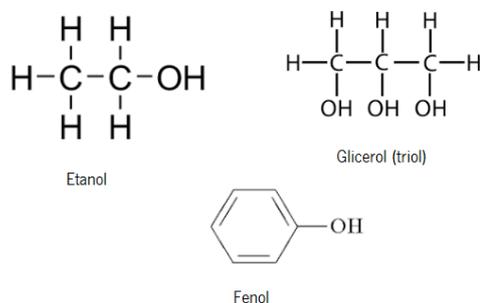


Figura 9 – Estrutura química do etanol, glicerol e fenol.

Etanol

O etanol é, depois da água, o constituinte maioritário do vinho e juntamente com esta, influencia as características do meio. É sem dúvida o álcool mais importante do vinho e o principal produto da fermentação alcoólica da levedura. A sua presença no produto final é dependente das condições de fermentação, particularmente no que respeita à temperatura, ao tipo de levedura e à concentração de açúcares [4].

O etanol tem múltiplas funções no vinho, fornece doçura e é relativamente macio na boca, pelo que o seu teor, está de certo modo, estritamente associado à qualidade do vinho, embora não seja o único fator. Para além das importantes funções organoléticas, também tem um papel importante no controlo microbiano, dado que o aumento da sua concentração durante a fermentação, inibe o seu crescimento, agindo então como um conservante do vinho. O etanol atua também como um reagente essencial na formação de vários compostos voláteis importantes que acrescentam o seu próprio odor distintivo. Juntamente com outros álcoois, o etanol reage lentamente com ácidos orgânicos para produzir ésteres [7].

Glicerol

O polioli do vinho mais proeminente é o glicerol, que se forma durante a etapa de fermentação, variando entre 6 g/L e 15 g/L. No vinho seco, o glicerol é o composto mais abundante, depois de água e etanol. Por conferir macieza ao vinho é também considerado um fator de qualidade, além de ser possuidor de um sabor ligeiramente doce. Dado afetar o perfil organolético do vinho, torna-se importante, novamente, controlar bem a fermentação. Em relação

a este componente, é essencial controlar a temperatura, o valor de pH, o arejamento e a concentração de dióxido de enxofre [7].

Considera-se, geralmente, que o glicerol é produzido com os “primeiros 50 g de açúcar fermentado”, correspondendo ao início da fermentação gliceropirúvica. Nesta altura, a única maneira de a levedura assegurar a reoxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$ é reduzindo a dihidroxiacetona a glicerol, dado que nesta fase a presença de acetaldeído é bastante reduzida para que ocorra esta reoxidação e se forme etanol. Quanto maior for a concentração de SO_2 no meio mais alta será a concentração de glicerol, dado que a molécula de SO_2 se combina com o acetaldeído impedindo a formação de etanol, aumentando a taxa de fermentação gliceropirúvica e a quantidade de glicerol produzido [31].

Álcoois Superiores

A fermentação anaeróbica de açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* gera uma variedade de metabolitos voláteis que contribuem para o perfil sensorial do vinho. Os compostos importantes incluem ésteres, álcoois superiores, ácidos gordos voláteis e compostos de enxofre voláteis. O acúmulo destes compostos no vinho depende do aspeto varietal (variedade e maturação da uva), da composição do mosto, da estirpe de levedura e das condições de fermentação, tais como a temperatura, a concentração de etanol, a oxigenação, o pH, a concentração de azoto e a de dióxido de enxofre [38,39]. A concentração de aminoácidos (precursores dos álcoois superiores) também deve influenciar a sua síntese. A produção total de álcoois superiores aumenta à medida que as concentrações dos aminoácidos correspondentes aumentam [38].

Os álcoois superiores, são álcoois com mais de dois átomos de carbono e apenas uma função álcool. Podem ser encontrados em uvas saudáveis, como o 2-etil-1-hexanol e o 2-feniletanol, mas raramente estão em concentrações significativas. A maioria dos álcoois superiores encontrados no vinho são subprodutos da fermentação alcoólica conduzida pelas leveduras [40]. Quando a sua concentração total no vinho é inferior a 300 mg/L contribuem de forma positiva para o aroma, sendo normalmente encontrado com valores superiores a 100 mg/L, acima de 400 mg/L são geralmente um fator negativo [41]. Os principais álcoois superiores dos vinhos, com concentração superior a 50 mg/L, são o 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), o 2-metil-1-butanol, o 2-metil-1-propanol (isobutanol) e o 2-feniletanol. Com concentrações menores

cita-se o 1-propanol, o 1-butanol, o 1-hexanol, o 3-metil-2-butanol, o 1-decanol e o 2-butanol [35]. Os álcoois superiores, os ácidos gordos voláteis e os seus ésteres são os principais responsáveis pelo aroma fermentativo dos vinhos [8].

Os álcoois superiores podem ser sintetizados pelo mecanismo de Ehrlich, que tem início em alguns aminoácidos que foram sintetizados pela levedura ou que estão presentes naturalmente no mosto. Neste processo, os álcoois são formados pela degradação dos aminoácidos, que seguem um mecanismo de desaminação, descarboxilação e redução – via catabólica (Figura 10) [16]. A desaminação de aminoácidos é especialmente importante na geração de álcoois superiores de cadeia mais longa [31]. Por outro lado, outros álcoois superiores que não derivam do catabolismo de aminoácidos, podem ser sintetizados a partir do metabolismo dos açúcares, via piruvato, tendo como intermediários os ácidos cetónicos [35].

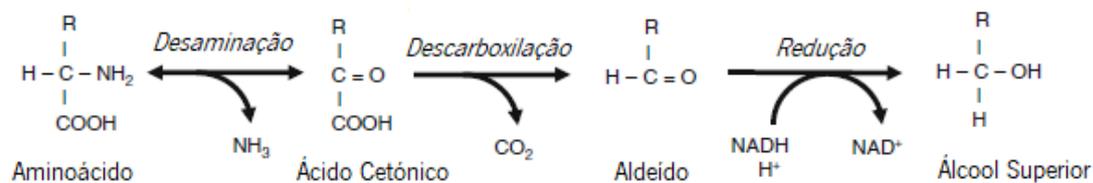


Figura 10 – Produção de álcoois superiores pela via catabólica (Reação de Ehrlich). Adaptado de Ribéreau-Gayon [31].

Os álcoois superiores também desempenham um papel indireto no desenvolvimento do vinho envelhecido. Ao reagir com os ácidos orgânicos, eles aumentam o número de ésteres encontrados no vinho. Durante a fermentação, a formação de ésteres ocorre rapidamente sob o controlo de enzimas e de levedura. Certas reações de esterificação continuam durante o envelhecimento, mas a um ritmo muito mais lento e não enzimático [31].

Ésteres

Na uva não estão presentes muitos ésteres, mas destaca-se principalmente o éster fenólico, antranilato de metilo [34]. Os principais ésteres encontrados no vinho derivam essencialmente da fermentação alcoólica. Os ésteres do vinho produzidos pelas leveduras têm duas origens distintas: esterificação enzimática durante o processo de fermentação e esterificação química durante o envelhecimento a longo prazo [31]. Contudo, os ésteres produzidos durante a

fermentação desempenham um papel sensorial muito importante na composição nos vinhos, dado fornecerem odor frutado.

Os ésteres são os compostos mais encontrados no vinho, mas na maioria são encontrados apenas em quantidades muito pequenas, e têm baixa volatilidade ou odores suaves, pelo que a sua importância para a fragrância do vinho é provavelmente insignificante [7], como o caso de ésteres de ácidos fixos [4]. No entanto, os ésteres mais comuns estão presentes acima ou no limite dos seus limiares sensoriais [7]. Incluem-se dois grandes grupos, os acetatos de álcoois superiores e os ésteres etílicos de ácidos gordos. O acetato de etilo, o acetato de 2-metilpropilo (acetato de isobutilo), o acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) e o acetato de 2-feniletilo, são acetatos de álcoois superiores. Como exemplos de ésteres etílicos de ácidos gordos, existe o butirato de etilo e o hexanoato de etilo. Pensa-se que a maior parte dos ésteres etílicos de ácidos gordos sejam formados enzimaticamente através da esterificação dos ácidos gordos CoA [33].

Os ésteres são formados quando uma função alcoólica reage com uma função ácida, onde uma molécula de água é eliminada. A Figura 11 representa a formação de acetato de etilo a partir de ácido acético e de etanol [15]. Os ésteres mais significativos que se encontram no vinho são formados entre etanol e ácidos gordos de cadeia curta, ácido acético com vários álcoois de cadeias curta e ácidos não voláteis e etanol [4].

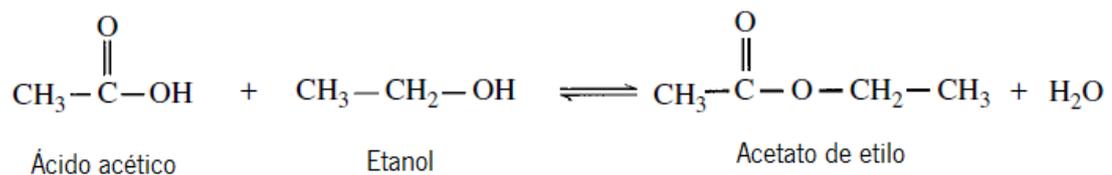


Figura 11 – Balanço de esterificação do etanol com o ácido acético.

Fermentações a baixas temperaturas, na ordem dos 10 °C, favorecem a síntese de ésteres frutados, como o acetato de isobutilo e o butirato de etilo, enquanto que temperaturas mais altas, na ordem dos 15 °C a 20 °C, é promovida a formação de ésteres de alto peso molecular, como o octanoato de etilo e o acetato de 2-feniletilo. Os baixos níveis de SO₂ e a clarificação promovem a síntese e retenção de ésteres. A ausência de oxigénio durante a fermentação também promove a formação de ésteres [7].

Fenóis

Os fenóis têm um grande impacto na qualidade do vinho. São um grande e complexo grupo de compostos com uma importância primordial para as características dos vinhos. Apesar de se encontrarem em menor concentração nos vinhos brancos, estes compostos também atuam de um modo significativo na sua qualidade. Os fenóis conseguem influenciar a cor do produto, tendo assim um impacto a nível da aparência, mas afetam também a nível do sabor, sensação na boca e aroma [7]. A grande maioria dos compostos fenólicos que se encontram no vinho tem origem na uva, somente uma pequena quantidade vestigial deriva do metabolismo da levedura [4]. São metabólitos secundários e sintetizados por plantas durante a sua fase de crescimento [34].

Quimicamente, os fenóis possuem um ou mais grupos hidroxilo associados a um anel aromático. Apesar de conterem grupos álcool, eles não demonstram propriedades típicas dos álcoois, pelo que são comumente tratados num grupo à parte [7]. Os compostos fenólicos podem ser separados em dois grupos, de acordo com a similaridade das suas cadeias de átomos de carbono: não-flavonoides (fenóis simples e ácidos fenólicos) e flavonoides (antocianinas, flavonóis e flavanóis) [31]. Os flavonoides são caracterizados por um esqueleto $C_6-C_3-C_6$, constituídos por dois anéis fenólicos (A e B) unidos por um anel pirano que contém oxigénio (C), como observado na Figura 12. Grande parte da cor e da estrutura dos vinhos deve-se a esta família de compostos. Os flavonoides constituem cerca de 85 % do teor fenólico nos vinhos tintos, enquanto que nos vinhos brancos representam apenas 20 %. A percentagem restante consiste em compostos não-flavonoides [7]. Este conteúdo varia consideravelmente devido à maceração com as grainhas e as películas no caso do vinho tinto, que permite uma maior extração dos flavonoides. Os flavonoides mais comuns são as antocianinas, que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azuis, violeta e pelos tons de vermelho que aparecem em flores, frutos, folhas, caules e raízes. Nas videiras, acumulam na película da uva tinta e são responsáveis pela coloração das castas das uvas tintas [38,43]. As antocianinas são, portanto, um constituinte importante para o vinho tinto, principalmente para a coloração [34].

O processo de vinificação de uvas brancas não é o mesmo do que se aplica às uvas tintas. Na vinificação em branco, a principal diferença consiste na ausência de maceração das partes sólidas da vindima, pelo que o vinho branco não incorpora as substâncias de aroma herbáceo do engaço e da película. De forma resumida, na vinificação tradicional em branco, as uvas depois da

receção, são desengaçadas, esmagadas, procedendo-se depois à extração do mosto por prensagem mecânica. Desta forma, os vinhos brancos obtêm uma cor e sabor diferentes dos vinhos tintos [39].

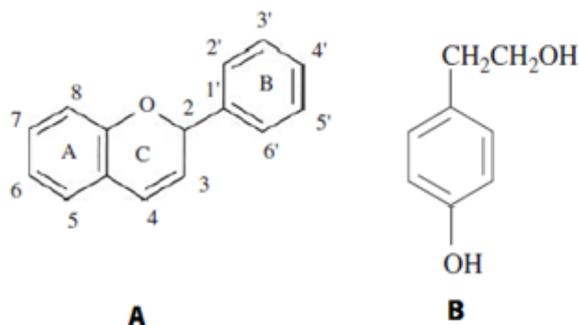


Figura 12 – Esqueleto de um composto flavonoide – A – e de um não-flavonoide – B – (tirosol).

Os não-flavonoides, são estruturalmente mais simples, os mais numerosos e variados são os ácidos cinâmicos (que possuem um esqueleto C₆-C₃) e os seus derivados, aparecendo sobretudo na forma de ésteres com ácido tartárico ou ligados a açúcares, mas também se podem associar a vários álcoois ou outros ácidos orgânicos. O não-flavonoide mais comum nas uvas é o ácido caftárico (um *o*-difenol). Muitas vezes, desempenha um papel importante no escurecimento oxidativo do mosto. Em pequenas quantidades, os derivados oxidados dos ácidos caftárico e cutárico podem doar grande parte da coloração amarelo-ouro ou palha dos vinhos brancos [4]. A este grupo ainda se pode adicionar o tirosol, cuja origem, ao contrário dos anteriores, não está na uva, mas sim na fermentação. Por este motivo, os primeiros encontram-se em baixas concentrações nos vinhos brancos e o tirosol existe em concentrações semelhantes nos vinhos brancos e tintos [8]. Os ácidos fenólicos, são usualmente encontrados em baixas concentrações, mas representam um dos principais compostos das uvas brancas, influenciando o aroma e gosto dos vinhos [34].

A levedura *S. cerevisiae* é capaz de descarboxilar os ácidos fenólicos (*p*-cumárico e ferúlico), provenientes das uvas, formando fenóis voláteis. Estes ácidos atuam como precursores de compostos aromáticos. Os principais fenóis voláteis formados durante a fermentação alcoólica são o 4-vinilfenol e o 4-vinilguaiacol. Geralmente, o 4-vinilfenol é mais abundante que o 4-vinilguaiacol, dado que o ácido *p*-cumárico está presente na uva em maiores quantidades do que o ferúlico [35].

Acidez Total, Acidez Fixa e Acidez Volátil

Os parâmetros acidez fixa e acidez volátil devem ser controlados ao longo da fermentação. A acidez total, que corresponde à acidez titulável do mosto ou do vinho, representa a soma de todos os ácidos presentes, isto é, ácidos inorgânicos e ácidos orgânicos [31], e são eles que conferem o gosto ácido à bebida. Estes ácidos provêm do mosto (ácido málico, tartárico e cítrico) ou da fermentação (ácido láctico, succínico e acético).

A presença de ácidos é importante do ponto de vista enológico, na medida em que atuam como conservantes, inibindo a proliferação de microrganismos, além de fornecerem ao vinho uma sensação de frescura [4]. A acidez total representa a soma da acidez volátil e da acidez fixa.

Os ácidos são caracterizados pela ionização e libertação de iões de hidrogénio na água (H^+). Relativamente aos compostos orgânicos, esta propriedade está associada ao grupo carboxílico, que se dissocia num radical carboxílico carregado negativamente e num ião de hidrogénio carregado positivamente. Os ácidos inorgânicos, tais como o ácido carbónico (H_2CO_3), dissociam-se num ião carregado negativamente e um ou mais iões de hidrogénio carregados positivamente [31], como representado na Figura 13.

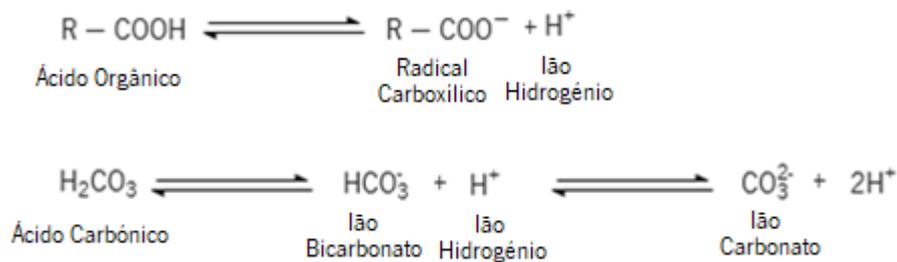


Figura 13 – Ionização e libertação de iões de hidrogénio na água, de um ácido orgânico e um ácido carbónico. Adaptado de Ribéreau-Gayon [31].

O grau de ionização no vinho depende principalmente do teor de catiões (sobretudo de potássio), do pH e das características ionizantes do ácido particular. Para a maioria dos vinhos de mesa, é desejável uma gama de acidez total, expressa como ácido tartárico, entre 5,5 mg/L e 8,5 mg/L [4].

Acidez Volátil

A acidez volátil é considerada um parâmetro físico-químico de grande importância, a ser monitorizado ao longo do processo de vinificação. Corresponde à soma dos ácidos gordos da série acética presentes no vinho, no estado livre e combinados com sais [20]. O ácido acético é o maior representante deste grupo, contribuindo com cerca de 90 % da concentração total dos ácidos voláteis e contribui com aromas e sabores agradáveis, quando em concentrações reduzidas, na ordem dos 0,2 g/L a 0,3 g/L. Numa concentração mais reduzida encontram-se outros ácidos carboxílicos, como o ácido butírico e o ácido propiónico [31].

Apesar de, quantitativamente, o grupo dos ácidos voláteis ser representado por uma pequena fração, estes têm uma grande importância a nível da qualidade organolética do vinho. Na realidade, quando se verifica que existe acidez volátil excessiva, geralmente apresenta um efeito organolético negativo no vinho. Esta característica organolética está relacionada com uma concentração anormalmente elevada de ácido acético. Quando o ácido acético se encontra em valores elevados, pode indicar a presença de bactérias acéticas ou lácticas [31].

O mosto das uvas saudáveis não contém acidez volátil. Os ácidos que contribuem para a acidez volátil surgem durante as fermentações alcoólica e malolática. A presença de oxigênio promove a formação de ácido acético, dado que este pode resultar da hidrólise de acetil-CoA, sendo limitada em condições de anaerobiose. Também pode ser formado pela oxidação do acetaldeído pela enzima aldeído-desidrogenase (Figura 14) [15]. Assim, este ácido é formado tanto no início da fermentação alcoólica como no final. Finalmente, o ácido acético no vinho está ligado à presença de acetato de etilo, o éster etílico do ácido acético [31].

Acidez Fixa

A acidez fixa é constituída pelos ácidos orgânicos não voláteis, não ionizados presentes no vinho. Quantitativamente, eles controlam o pH do vinho. Estes ácidos são formados durante a fermentação (sendo os principais, ácido láctico e ácido succínico) ou têm origem na uva (ácido tartárico, ácido málico e ácido cítrico). De facto, os dois ácidos dicarboxílicos que têm origem na uva (tartárico e málico) constituem frequentemente mais de 90 % da acidez fixa, dominando a composição ácida dos vinhos [7,31].

Durante a fermentação alcoólica, a concentração do ácido tartárico diminui em consequência da diminuição da sua solubilidade [31]. O ácido precipita como tartarato de cálcio

ou como bitartarato de potássio [34], provocando uma diminuição da acidez total. Em casos de insuficiência de acidez, a lei autoriza a adição deste ácido, não excedendo 1,5 g/L [4,42].

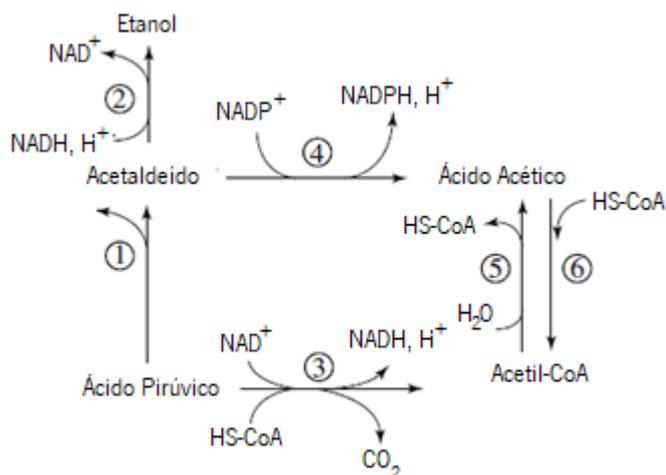


Figura 14 – Formação de ácido acético por leveduras. 1 – piruvato-descarboxilase, 2 – álcool-desidrogenase, 3 – piruvato-desidrogenase, 4 – aldeído-desidrogenase, 5 – acetil-CoA hidrolase e 6 – acetil-CoA sintase. Adaptado de Ribéreau-Gayon [15].

Os ácidos no vinho têm o papel de manter um pH baixo que tem um efeito antimicrobiano benéfico. A maioria das bactérias não crescem a valores baixos de pH. Durante a fermentação, os ácidos estão envolvidos em reações que conduzem à formação de ésteres. Estes são frequentemente importantes para a fragrância fresca e frutada dos vinhos. A acidez também afeta a ionização de compostos fenólicos. O estado ionizado é mais facilmente oxidado do que a sua forma não ionizada. Conseqüentemente, os vinhos de pH elevado (> 3,9) são muito suscetíveis à oxidação e à perda da sua cor jovem [7].

Os principais ácidos inorgânicos do vinho são os ácidos carbônico e sulfuroso, que também se encontram presentes na sua forma gasosa CO₂ e SO₂. Por serem mais importantes no vinho como gases e não afetarem visivelmente o pH do vinho ou a acidez perceptível, a discussão destes ácidos é apresentada mais adiante neste capítulo (gases dissolvidos). Assim, no cálculo da acidez total, deve ser feita uma correção relativamente à acidez correspondente ao CO₂ e SO₂. De facto, concentrações elevadas de dióxido de carbono tendem a levar a uma superestimação da acidez total, especialmente nos vinhos espumantes. Isto também é verdade para os vinhos jovens, que têm sempre um alto teor de CO₂ logo após a fermentação. Os vinhos devem, portanto, ser desgaseificados antes da análise da acidez total e volátil [7,31].

Gases dissolvidos

Os gases que se podem encontrar dissolvidos nos vinhos são o O_2 , o CO_2 e o SO_2 . O CO_2 possui grande importância no caso dos vinhos espumantes. Nos vinhos tranquilos brancos, aquando da fermentação, grande parte deste é libertado para a atmosfera, e apesar de o vinho ainda ser rico em CO_2 , a sua concentração diminui com o tempo, não apresentando efeitos a nível organolético [4].

O CO_2 surge essencialmente pelo metabolismo da levedura, mas pequenas quantidades podem ser geradas por bactérias ácido lácticas ou durante envelhecimento, pela decomposição de aminoácidos e fenóis. No fim da fermentação, o vinho permanece normalmente sobressaturado com CO_2 , mas a sua concentração diminui durante o engarrafamento. A esta concentração, o CO_2 não tem nenhum efeito sensorial; somente acima de 5 g/L o CO_2 começa a produzir sensação na boca [7].

O SO_2 , é um componente normal do vinho, resultante essencialmente do metabolismo da levedura. A sua concentração final varia de acordo com a temperatura de fermentação, a estirpe de levedura e o teor de enxofre no mosto [7]. Geralmente são obtidas concentrações inferiores a 10 mg/L [15]. Alternativamente, pode ser adicionado de várias formas, como em SO_2 gasoso, SO_2 em solução ou em sal como metassulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) [7]. A levedura naturalmente consome todo o açúcar residual e a fermentação termina por limitação de nutrientes ou pela presença de substâncias tóxicas. Contudo, a fermentação pode ser interrompida quando se atingir o nível de açúcar residual pretendido, adicionando-se, nesse caso teores elevados de SO_2 . Segundo o Regulamento (CE) N.º 606/2009, o teor máximo permitido de SO_2 em vinhos brancos é de 200 mg/L, para vinhos cujo teor de açúcar expresso pela soma glucose+frutose seja menor que 5 g/L. Em vinhos cuja concentração desses açúcares seja igual ou superior a 5 g/L o teor máximo de SO_2 em vinhos brancos é de 250 mg/L [43]. Embora a sua presença em excesso seja indesejada, quando presente em quantidades reduzidas, é bastante benéfica, dado que tem:

- i. Atividade antisséptica, inibindo ou destruindo leveduras e bactérias;
- ii. Propriedade antioxidásica, inibindo ou destruindo enzimas oxidativas;
- iii. Ação dissolvente, facilitando a extração de compostos das células, como compostos fenólicos;
- iv. Propriedade antioxidante, capaz de proteger os compostos fenólicos e os compostos odoríferos da oxidação dos vinhos e dos mostos.

Em grandes concentrações, pode conduzir a problemas na saúde do ser humano, além de diminuir a qualidade organolética do vinho [44]. Na água pura, seriam suficientes 0,05 g/L de SO₂ para limitar o crescimento de bactérias e leveduras. No mosto são necessários cerca de 1,2 g/L a 1,5 g/L de SO₂ para se obter os mesmos resultados. Esta diferença deve-se ao facto de que no mosto, uma grande parte do SO₂ adicionado combina-se com diversos constituintes, ficando inativado [18]. Assim, o SO₂ pode ser encontrado na sua forma livre ou combinado, sendo que apenas a fração livre tem interesse enológico [8]:

Fração de SO₂ livre: Na sua forma livre, ele dissocia-se em três formas, SO₂ molecular (quantidade reduzida), na forma de íão sulfito, SO₃²⁻ (quase inexistente), e a grande maioria encontra-se na forma HSO₃⁻ (ião bissulfito) [7]. A sua forma molecular, que representa uma minoria do SO₂ dissolvido, é a única que tem ação antioxidante, antioxidástica e antissética [18]. A quantidade de SO₂ livre na forma molecular é influenciada pelo pH. Quanto mais baixo o pH, próximo de 3, maior será a quantidade de SO₂ livre no estado molecular [8].

Fração de SO₂ combinado: Representa a fração de SO₂ que está associado a outros componentes do vinho, de forma mais ou menos estável. Por exemplo, o SO₂ combina-se de forma bastante estável com o acetaldeído, mas em relação à glucose a ligação é reversível, sendo que o SO₂ se liberta quando a sua forma livre diminui. Esta reação pode ser reversível ou irreversível de acordo com o grau de afinidade (Tabela 2). Note-se que quanto maior a taxa de combinação de SO₂ menor o grau de dissociação. Com o aumento da temperatura a combinação de SO₂ com a outros compostos diminui e maior é a fração livre (forma bissulfito) [8].

Nas fermentações alcoólicas, as fontes de enxofre utilizadas pelas leveduras são os sulfatos, os sulfitos, o enxofre elementar e os aminoácidos sulfurados. O sulfito é em parte produzido pela levedura, mas normalmente é adicionado durante a produção de vinhos brancos (tanto antes como depois da fermentação) devido à sua atividade antioxidante e antimicrobiana. O sulfato e os aminoácidos sulfurados estão presentes naturalmente nos mostos, uma vez que estão presentes nas uvas. Os compostos sulfurados formados pelas leveduras são essencialmente tiois, mono e polissulfuretos, e tioésteres [35].

A presença de compostos sulfurados inorgânicos em vinhos está associada à adição de substâncias antimicrobianas ou antioxidantes utilizadas no processo de vinificação. Contudo a maior parte dos compostos sulfurados apresenta origem orgânica, sendo sintetizados durante o processo de fermentação a partir da degradação de alguns aminoácidos [16]. Os compostos

sulfurados voláteis são compostos aromáticos potentes que têm valores sensoriais muito baixos na gama dos ng/L a µg/L. Um grande número de compostos de enxofre aparece associado à fermentação. A maioria dos compostos de enxofre está associada a aromas desagradáveis, sendo considerados indesejáveis ou um defeito no vinho. Uma exceção é representada pelos compostos de enxofre polifuncionais de cadeia longa, que em baixas concentrações são caracterizados por aromas frutados. O aparecimento de compostos voláteis ao longo da fermentação está associado a um processo químico e bioquímico complexo, multifacetado. As leveduras produzem H₂S e outros compostos de enxofre voláteis por uma série de vias, que incluem redução química de S elementar, degradação de aminoácidos de enxofre ou redução de sulfito ou sulfato. Além da redução do enxofre inorgânico em H₂S, poucas das vias químicas e/ou metabólicas para a formação de outros compostos de enxofre voláteis foram relatadas ou verificadas na fermentação do vinho [33].

Tabela 2 – Taxa de combinação do SO₂ (t_x) com diversos componentes do vinho, Adaptado de Rosado [8]

Componente	$\frac{t_x}{\%}$
Acetaldeído	> 99
Antocianinas	93 a 95
Ácidos cetônicos	61 a 72
Produtos da oxidação dos açúcares	36 a 72
Ácidos urónicos	2 a 4
Açúcares	0 a 2

Os compostos de enxofre voláteis que apresentam um ponto de ebulição inferior a 90 °C são sobretudo citados pelas suas implicações nos defeitos aromáticos dos vinhos como o sulfureto de hidrogénio e o sulfureto de carbonilo. No entanto, são normalmente encontrados em concentrações inferiores a 1 µg/L, atingindo, os mais abundantes, algumas dezenas de µg/L [35]. O H₂S, embora muito evidente quando produzido durante a fermentação, é altamente volátil e rapidamente perdido em vinhos jovens [33]. Os que apresentam um ponto de ebulição superior a 90 °C, participam no aroma de forma mais complexa, como o 2-metiltoetanol e o 2-mercaptoetanol. Com algumas exceções, estes podem ser encontrados com concentrações inferiores a 0,1 mg/L [34].

2.2.1 Classificação do aroma do vinho

Na constituição do vinho apenas os componentes voláteis – como álcoois, ésteres, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas, terpenos, etc. – conseguem estimular o órgão olfativo, onde o ser humano o sente como aroma [45]. O olfato constituiu uma das propriedades mais importantes no exame sensorial e de facto, as propriedades odoríferas têm uma grande influência na aceitação ou na rejeição do vinho [46]. A sua intensidade não depende somente da sua concentração na fase líquida, mas também da volatilidade, pressão de vapor e do seu limiar de percepção olfativa. Fala-se de limiar de percepção olfativa, como o mais pequeno estímulo que é capaz de produzir uma sensação olfativa em pelo menos 50 % dos provadores [35]. Os componentes voláteis do vinho podem ser apercebidos a concentrações muito baixas, podendo alguns ter limiares abaixo de 10^{-12} g/L [41]. De facto, falar sobre os compostos voláteis do aroma do vinho é um assunto muito complexo, uma vez que existem uma grande variabilidade de compostos, e cada um apresenta o seu próprio limiar de percepção olfativa. Existem alguns fatores que influenciam a quantidade de compostos aromáticos presentes no vinho, incluindo fatores ambientais, como o clima e condições do solo, as condições de fermentação (pH, temperatura, nutrientes do mosto e a levedura), bem como os vários tratamentos de pré-fermentação que o vinho possa ser submetido, como prensagem, maceração e clarificação [41].

Uma classificação clássica dos aromas do vinho consiste em quatro categorias, consoante a sua origem: aroma varietal que provém da uva; aroma pré-fermentativo, que representa os compostos voláteis formados durante as operações para a obtenção e armazenamento do mosto; aroma fermentativo, como o nome indica, representado pelos compostos originados pelas leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica e/ou malolática; e aroma pós-fermentativo, que está relacionado com as reações que ocorrem durante os processos de conservação e/ou envelhecimento do vinho [31,41].

Aroma Varietal

O aroma varietal do vinho é específico da casta, sendo influenciado também por fatores ambientais como o clima, as condições do solo e o estado de maturação das uvas [31]. A maioria das castas é pouco aromática, possuindo essencialmente precursores de aromas com potencialidade para originar compostos aromáticos (*e.g.* ácidos gordos, compostos fenólicos, glicosídeos) [35].

Os terpenos são um dos principais componentes associados à tipicidade aromática das castas. Alguns destes compostos são detetados diretamente nos mostos, denominado aroma varietal livre, constituído por substâncias voláteis e odoríferas presentes, como o geraniol, o nerol e o linalol [47]. As substâncias inodoras nos mostos mas que são capazes de originar compostos aromáticos no vinho, são denominados como precursores de aroma, podendo ser precursores não voláteis e inodoros, como os glicosídeos [35,47], ou podem ser compostos voláteis odoríferos, que devido à sua instabilidade química são capazes de se transformar em outros compostos odoríferos, como os dióis terpénicos [47].

Quimicamente, os terpenos são caracterizados pelo seu esqueleto de carbono distintivo, consistindo em estruturas compostas pela repetição de duas, três, quatro, cinco, seis e sete unidades básicas de isopreno, de cinco carbonos. Estes são chamados monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos e tetraterpenos, respetivamente. Mas, os mais interessantes do ponto de vista olfativo são os álcoois monoterpénicos como o linalol, o α -terpineol, o nerol, o geraniol, o citronelol e o HO-trienol. Os limiares de perceção olfativa destes compostos são bastante baixos, da ordem de poucos $\mu\text{g/L}$ [4,31,35]. Os monoterpenos podem conter uma variedade de grupos funcionais, nomeadamente, aldeídos (linalal, geranial, neral), álcoois (linalol, geraniol), ácidos (ácido linalílico e gerânico) e ésteres (acetato de linalilo).

Outros dois grupos de compostos odoríferos que contribuem para o aroma varietal, e que são muito estudados, são os norisoprenóides em C_{13} e os tióis voláteis [35]. Os compostos pertencentes ao primeiro grupo não considerados estritamente terpenos e são produzidos pela degradação química ou enzimática dos carotenóides nas uvas, e estão presentes na uva principalmente sob a forma de precursores glicosilados [31]. Os tióis voláteis, como o 3-mercaptohexanol e o acetato de 3-mercaptohexilo, têm *LPO* muito baixos, sendo compostos muito importantes para o aroma dos vinhos [35].

Aroma Pré-fermentativo

Os compostos pré-fermentativos são, essencialmente, os álcoois e aldeídos com 6 átomos de carbono, formados a partir de dois precursores, o ácido linoleico e o ácido linolénico existentes nas uvas, sob a ação enzimática na presença de ar. O aroma reconhecido é de facto proveniente das uvas, mas só se torna identificável no decorrer do processo de vindima e das operações que se seguem, como o transporte e prensagem. Estas etapas é que permitem a incorporação de

oxigénio necessário para a oxidação enzimática [35]. Os compostos voláteis que daqui advém têm aroma herbáceo e possuem um limiar de perceção relativamente baixo. Por exemplo o limiar de perceção olfativa do 1-hexanol é 4,5 µg/L [47].

Aroma Fermentativo

O aroma do vinho deve-se principalmente à fermentação alcoólica. As leveduras convertem os açúcares presentes no mosto em etanol e CO₂, como produtos principais. Contudo também produzem variadíssimos compostos voláteis, responsáveis pelo aroma do vinho, sendo essencialmente álcoois superiores, ácidos orgânicos e os seus ésteres, e em menor extensão os aldeídos, que formam o “*bouquet*” fermentativo [35,47].

Os fatores que mais influenciam o aroma fermentativo dos vinhos são as condições de fermentação e a estirpe de levedura usada [35]. A constituição do mosto relativamente a aminoácidos também pode ter uma influencia acentuada na produção dos álcoois superiores [47]. Os ésteres apresentam odores agradáveis, principalmente frutados, com exceção do acetato de etilo, que não é bem aceite para valores próximos ou superiores a 100 mg/L. Os restantes produtos voláteis formados durante a fermentação aparecem em concentrações inferiores [35].

Aroma Pós-fermentativo

Os aromas pós-fermentativos são os aromas que resultam de transformações ocorridas durante o armazenamento, envelhecimento e conservação do vinho, devido a reações de oxidação-redução dos seus componentes. Dependem essencialmente do tempo, da temperatura e do recipiente de armazenamento: garrafa, cuba inox, vasilha de madeira, entre outros [35]. Os aromas por oxidação, derivam da madeira que constitui a vasilha onde o vinho está, e também pela passagem de oxigénio pelas paredes porosas da madeira, que oxida os componentes do vinho. Os aromas de redução, resultam do envelhecimento dos componentes do vinho na garrafa [47].

2.3 O papel das leveduras na vinificação

A biotecnologia aplicada à vinificação inclui vários aspetos, tais como a monitorização da população microbiana, o uso de culturas *starter* e o controlo do crescimento de leveduras indesejadas [48]. A vinificação é um processo complexo que envolve uma cultura microbiana e o

mosto de uva, resultando em vinho. Os principais microrganismos a atuar na fermentação alcoólica são leveduras, que convertem o mosto numa bebida alcoólica distinta e rica em compostos. A via glicolítica central fornece energia, moléculas precursoras, manutenção e reprodução celular, acoplada à formação de etanol. A este processo estão associadas outras vias metabólicas que levam à formação de metabolitos voláteis e não voláteis que contribuem para a caracterização final do vinho [33].

A investigação sobre o papel da levedura no desenvolvimento do sabor do vinho revelou complexas interações entre a cultura microbiana e os compostos presentes na uva [33]. As características finais do vinho dependem da uva em si, mas em grande parte, dependem também das leveduras que estão a atuar durante a fermentação do mosto. Assim, a partir do mesmo mosto, fermentações sob condições idênticas, mas realizada por leveduras distintas, podem conduzir a vinhos com características diferentes, devido à diversidade de metabolitos [49].

O processo de fermentação pode ser conduzido por inoculação de uma levedura selecionada ou, por outro lado, pode ocorrer espontaneamente, pela flora nativa presente nas uvas. Em ambos os casos, a fermentação será eventualmente dominada por leveduras do género *Saccharomyces*, sendo comumente encontradas duas espécies, a *S. cerevisiae* e a *S. bayanus* [50]. Durante a fermentação do mosto podem estar presentes várias espécies de leveduras e de bactérias. Assim, a qualidade do vinho está em grande parte relacionada com o complexo microbiano a atuar durante as fermentações [51,52]. Diferentes castas e vindimas em anos distintos podem apresentar populações microbianas diferentes, que irão influenciar a produção e quantidade dos produtos formados [49]. Por este motivo é que as leveduras têm sido objeto de investigação e seleção em função de diferentes critérios, na tentativa de melhorar a qualidade do vinho [30].

2.3.1 Características da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Em qualquer sistema biológico, o crescimento microbiano pode ser definido como o aumento ordenado de todos os seus constituintes celulares [53]. Todos os microrganismos necessitam de um conjunto de fatores que lhes permitam crescer num determinado ambiente. Esses fatores que influenciam o crescimento microbiano são fatores químicos, físicos e concentração de nutrientes. Ao controlar esses fatores é possível inibir ou estimular o crescimento,

uma vez que cada microrganismo tem condições específicas de crescimento para que possa atingir a sua taxa máxima [54].

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é uma das leveduras presentes naturalmente na película da uva. Apesar de se encontrar em quantidades reduzidas é a que se desenvolve melhor no mosto e a que se encontra no final da fermentação. A nível enológico ela é preferencialmente usada em detrimento de outras espécies de levedura devido à sua [4]:

- i. Resistência a elevadas concentrações de açúcares presentes no mosto;
- ii. Resistência a baixos valores de pH;
- iii. Resistência a elevadas concentrações de SO₂;
- iv. Resistência a elevados teores de etanol;
- v. Elevada produção de etanol (sintetiza cerca de 1 % de etanol, em volume, por cada 16,5 g/L a 18 g/L açúcares do mosto – glucose e frutose).

Outros fatores de stress conhecidos que ocorrem durante certas fermentações alcoólicas são, por exemplo a falta de nutrientes e a concorrência de outros microrganismos. Estes fatores de stress têm grande impacto sobre a levedura afetando a fermentação. Se a levedura não for capaz de se adaptar a estas condições, pode levar à diminuição ou mesmo paragem da fermentação [20,50].

Os produtores de vinho enfrentam uma concorrência cada vez mais intensa, dado existirem mudanças das preferências dos consumidores, que exigem cada vez mais vinhos de alta qualidade a preços reduzidos. Conseqüentemente, é necessário transformar a indústria vitivinícola continuamente, de uma indústria de produção para uma indústria voltada para o mercado. Contudo, este processo dependente de vários fatores, como por exemplo da inovação biotecnológica. As leveduras de vinho orientadas para o mercado estão atualmente a ser desenvolvidas de forma a garantir uma produção de vinhos com um custo competitivo, uma minimização de recursos, uma melhor qualidade e um baixo impacto ambiental [55].

2.3.2 Leveduras vnicas não-*Saccharomyces*

O mosto de uva é um meio não estéril que contém muitos tipos de microrganismos que o podem fermentar [2]. O teor de nutrientes do mosto, as condições de fermentação alcoólica e a(s)

espécie(s) de levedura(s) a atuar durante a fermentação vão definir a produção dos metabolitos voláteis e não voláteis e, conseqüentemente, o perfil sensorial do vinho. Todos estes compostos que estão presentes no mosto, produzidos e modificados durante a fermentação, e por outros processos, contribuem para o carácter distintivo varietal do vinho [33]. Os aromas e os sabores dos vinhos dependem, essencialmente, das uvas e da atividade biológica dos organismos presentes [50].

A fim de se assegurar uma rápida e completa fermentação, assim como garantir a produção de vinhos com uma qualidade característica, a prática da adição de leveduras selecionadas a mostos sulfitados tornou-se generalizada. Atualmente, a maioria das leveduras de vinho comerciais são da espécie *Saccharomyces cerevisiae* [20]. Contudo, a microflora autóctone da uva é altamente variável, existindo uma predominância de espécies de leveduras indígenas, pertencentes aos géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torulaspora*. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, está também presente, mas em baixas concentrações celulares [2,20,56]. Estas leveduras não-*Saccharomyces*, como se encontram presentes em maior quantidade no mosto, dominam o início da fermentação [8]. Contudo, à medida que a fermentação progride as leveduras não-*Saccharomyces* morrem, uma vez que se mostram pouco tolerantes ao etanol. Quando a concentração de etanol se aproxima de 4 % a 5 % em volume, a fermentação passa a ser dominado por uma ou mais estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* [25]. Vários fatores afetam a presença e a persistência de leveduras não-*Saccharomyces*, tal como a temperatura de fermentação, a prática de adição de nutrientes e o arejamento [50].

No passado, estas leveduras eram consideradas indesejadas dado que os mostos inoculados com culturas não-*Saccharomyces* demonstraram produzir vários metabolitos considerados desfavoráveis, em excesso, como ácido acético, acetato de etilo e acetaldeído [48]. Contudo, nas últimas décadas, fizeram-se grandes avanços no que diz respeito à compreensão da fisiologia e bioquímica das leveduras envolvidas no processo de fermentação. Descobriu-se que a utilização de leveduras não-*Saccharomyces* possui um papel relevante no impacto metabólico e na complexidade do aroma no produto final. Nesse contexto, a inclusão de leveduras não-*Saccharomyces* tem de ser pensada [2].

À medida que melhora a compreensão humana sobre os impactos que as leveduras têm sobre o vinho, começam a ser selecionadas estirpes que irão originar um resultado final

agradável [30]. A identificação química dos principais compostos aromáticos, a definição das bases genéticas e bioquímicas, assim como a associação das vias metabólicas têm permitido selecionar estirpes que irão contribuir de forma positiva para o perfil sensorial do vinho. A caracterização da *Saccharomyces* tem ampliado ainda mais a capacidade do ser humano de modelar o vinho, devido à variabilidade genética e metabólica. Contudo, numa busca de uma maior diversidade de sabor de vinho, começam-se a avaliar e inocular espécies não-*Saccharomyces* que estão presentes nas uvas [33].

Assim, e como consequência da reavaliação do papel das leveduras não-*Saccharomyces* no processo de vinificação, foram realizados vários estudos onde se avaliaram fermentações conduzidas por culturas *starter* mistas, ou seja, culturas constituídas por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e diferentes espécies de leveduras não-*Saccharomyces* que fazem parte do ambiente da uva. A utilização combinada de diferentes espécies resulta, frequentemente, em compostos imprevisíveis, o que pode afetar tanto a composição química como o perfil sensorial dos vinhos. Neste contexto, sabe-se hoje que quando são usadas culturas mistas de leveduras não-*Saccharomyces* com a *S. cerevisiae*, as atividades metabólicas das leveduras não-*Saccharomyces* podem não ser completamente expressadas. A título de exemplo, o uso de uma cultura mista de *Starmerella bombicola* e *S. cerevisiae*, permite aumentar o teor de glicerol no vinho [48].

O conhecimento das interações entre as leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica, ainda precisa de ser melhorado. Para atingir este objetivo, é necessária mais investigação sobre o fundo genético e fisiológico das leveduras não-*Saccharomyces*, de modo a ser possível a utilização de tais leveduras ou recorrer a fermentações de culturas mistas [2]. Contudo, torna-se fulcral conhecer e explorar os principais benefícios e defeitos das leveduras não-*Saccharomyces* para permitir a possibilidade de no futuro os vinicultores preferirem usar misturas de linhagem *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces* como espécies de cultura *starter*. Portanto, deve conhecer-se a sua importância na uva e no mosto, determinar quais as linhagens que conseguem crescer e sobreviver durante a fermentação, e essencialmente determinar os efeitos no produto final [49].

2.3.3 Culturas *starter*

A profusão de culturas *starter* selecionadas como formas de levedura seca ativas, permitiu uma utilização mais generalizada da fermentação inoculada, com consequentes melhorias no controlo do processo de fermentação [48].

Uma cultura *starter*, também designadas por leveduras industriais ou leveduras secas ativas (LSA), pode ser definida como uma preparação, inoculada no mosto de uva após supressão da população indígena, constituída por um número elevado de células de pelo menos um microrganismo, de forma a acelerar e conduzir o processo fermentativo. As leveduras permanecem num estado desidratado e é conservada a sua vitalidade por muito mais tempo, e quando hidratada retoma a sua atividade. Quando armazenadas num local seco e fresco podem manter a sua viabilidade por mais de um ano [30]. Estas estirpes industriais devem ser capazes de manter a viabilidade após a desidratação/reidratação. As culturas *starter* não são necessariamente constituídas por uma única estirpe [50].

O uso de culturas *starter* tornou-se uma prática bastante difundida na vinificação, por ser relativamente económica e simples [33]. Atualmente existem cerca de 200 LSA que são usadas pela maioria dos produtores de vinho a nível Europeu. O seu uso permite uma fermentação rápida e consistente, além de garantir a homogeneidade dos vinhos ao longo dos anos [57]. O uso de estirpes conhecidas ou bem caracterizadas permite assegurar a aceitabilidade comercial do vinho. As LSA foram selecionadas com base em atributos específicos, como: tolerância ao etanol, tolerância ao dióxido de enxofre, previsibilidade do comportamento fermentativo, esgotamento dos açúcares, produção de ésteres específicos desejáveis, capacidade de dominar as diversas condições de fermentação e a ausência da produção de metabolitos considerados negativos, tais como sulfureto de hidrogénio [50]. Assim, o uso de culturas *starter* permite simplificar o processo de fermentação e promove a consistência das características analíticas e sensoriais dos vinhos, garantindo o interesse tanto do consumidor como do produtor [2,56]. Os vinicultores sempre estiveram interessados em melhorar a cinética de fermentação e a qualidade do vinho. Por este motivo fica vantajoso adicionar ao mosto um inóculo com leveduras ativas para que desta forma, a concentração celular inicial seja mais elevada e o processo acelerado [15].

Contudo, o uso das culturas *starter* pode atenuar as propriedades regionais de alguns vinhos, dado que a maioria das culturas foram obtidas a partir de castas e regiões vitivinícolas

desconhecidas. Uma vez que as propriedades enológicas típicas de uma região provêm diretamente da microbiologia dessa mesma região, seria preferível usar culturas *starter* compostas por leveduras selecionadas e isoladas de uvas dessa região [56]. Além disso, o uso de espécies/estirpes autóctones é sempre preferível por estarem potencialmente melhor adaptadas ao microecossistema e às condições climáticas de cada região. O uso de leveduras selecionadas regionalmente, para além de otimizarem a fermentação, enaltecem as propriedades sensoriais e a tipicidade dos vinhos de cada região, comparativamente com as estirpes comerciais [57].

2.4 Análises físico-químicas do vinho

Uma análise completa dos parâmetros físico-químicos de um vinho é um processo bastante demorado, mas essencial, de forma a garantir que este cumpra todos os requisitos imposto pela legislação vigente. O Regulamento N.º 606/2009 [43] refere que os métodos de análise a utilizar para determinar a composição dos vinhos são os publicados pela OIV no Compêndio dos Métodos Internacionais de Análise dos Vinhos e Mostos. Nesse compêndio estão descritos os métodos oficiais para a análise de diversos parâmetros químicos, físicos e microbiológicos. Contudo, os métodos oficiais são bastante morosos, pelo que as adegas têm optado por adquirir equipamentos mais modernos capazes de analisar os diferentes parâmetros com uma maior rapidez. Uma dessas tecnologias é a espectroscopia de absorção na gama do infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR).

Os analisadores infravermelhos de transformada de *Fourier*, tecnologia FTIR, permite a identificação e a quantificação de compostos através de uma amostra de mosto, mosto em fermentação ou vinho, permitindo um controlo da qualidade quase instantâneo durante todo o processo de elaboração do produto. Esta tecnologia baseia-se no princípio que os diferentes compostos moleculares e iónicos, que constituem o mosto e o vinho, vibram quando expostos a radiações infravermelho (IV) [58].

O equipamento OenoFoss™ usa uma fonte de luz infravermelho que atravessa a amostra até um detetor. Os diferentes compostos emitem espectros com comprimentos de onda bem definidos e característicos de cada componente. Este equipamento deve estar associado a um computador onde está instalado um programa específico para processar os dados obtidos e assim se obter um resultado útil. Após a calibração da tecnologia para diferentes compostos, é possível

obter a quantificação dos diferentes componentes presentes na amostra. Este equipamento substitui várias análises demoradas por recolher dados de uma vasta gama espectral, sendo uma solução analítica, simples e rápida de usar [59,60].

O equipamento OenoFoss™ possui vários modelos de trabalhos, onde para cada um deles são analisados os principais parâmetros da amostra:

- i. Mosto: Sólidos Solúveis Totais (*SST*), Acidez Total (*AT*), pH, Acidez Volátil (*AV*), *Alpha Amino Nitrogen (AAN)*, Azoto amoniacal, Concentração de ácido tartárico ($C_{\text{Ác.Tartárico}}$), Concentração de ácido málico ($C_{\text{Ác.Málico}}$), Concentração de ácido glucónico ($C_{\text{Ác.Glucónico}}$) e massa volúmica (ρ);
- ii. Mosto em Fermentação: Título Alcoométrico Volúmico (*TAV*), *AV*, *AT*, $C_{\text{Ác.Málico}}$, Concentração de glucose e frutose ($C_{\text{glu+fru}}$) e pH;
- iii. Vinho: *TAV*, *AT*, *AV*, $C_{\text{glu+fru}}$, $C_{\text{Ác.Málico}}$, Concentração de ácido láctico ($C_{\text{Ác.Láctico}}$), Concentração de glucose (C_{glucose}), Concentração de frutose (C_{frutose}), pH e ρ .

Para complementar os resultados da tecnologia FTIR é usual usar a cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). Este sistema é constituído por uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna, um detetor (*e.g.* espectrofotómetro, refratómetro) e um sistema de tratamento de dados. É um método analítico que tem como objetivo a separação de distintas espécies químicas que estão presentes numa amostra. A amostra é inserida por uma seringa no sistema de injeção (constituído por um *loop* de volume fixo), e a separação processa-se por meio de um mecanismo de interação seletiva, entre as moléculas da amostra e duas fases líquidas (uma móvel e uma estacionária) [61]. Os componentes dessa amostra vão migrar através da coluna a diferentes velocidades devido ao seu tamanho, solubilidade, carga, afinidade e polaridade com as fases móvel e estacionária, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica. Cada substância eluirá da coluna, e será detetada, com um tempo de retenção característico do sistema de HPLC em uso e das condições operatórias. Cada substância apresentará um pico, que pode ter uma maior ou menor largura de base. A área desse pico é proporcional à concentração dessa substância na amostra, e o tempo de retenção servirá para a sua identificação. A substância com maior “afinidade” para com a coluna é aquela que elui por último e, em contrapartida, a substância que elui em primeiro lugar será a de menor “afinidade” para com fase estacionária.

A abordagem mais utilizada para a quantificação dos componentes voláteis do aroma é a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID) e a cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) [59]. Este sistema possuiu uma zona para a introdução da amostra e um gás de arraste que vaporiza a amostra assim que esta é introduzida. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada vai para a coluna cromatográfica (fase estacionária que pode ser um sólido adsorvente ou um líquido pouco volátil), onde ocorre a separação da mistura. As substâncias separadas passam por um detetor, um dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O sistema acoplado a um computador com um *software* adequado possibilita a análise quantitativa. No caso do FID a amostra é oxidada por uma chama de hidrogénio/ar e produz partículas eletricamente carregadas. Estes iões é que geram o sinal elétrico mensurado [62].

2.5 Análise Sensorial

O objetivo de todo o enólogo é atingir a qualidade, ou seja, é todo o conjunto das propriedades do vinho que os tornam apetecíveis pelo consumidor. O consumidor não tem em conta os parâmetros químicos do vinho, mas sim as particularidades que agradam os seus sentidos [20]. Assim, o consumidor retém uma grande importância para a definição de qualidade do vinho, daí a importância de se incluir as análises sensoriais para a sua aprovação.

Por mais completa que seja a análise química de um vinho, essa análise não fornece informações suficientemente precisas e completas sobre a sua qualidade: dois vinhos com um perfil de análise química semelhante podem ter características organoléticas diferentes. A análise química é indispensável para fornecer dados gerais sobre a composição do vinho, mas é através dos órgãos sensoriais que se consegue fazer uma caracterização organolética. Assim, a análise sensorial é, portanto, a fase final do controlo da qualidade dos vinhos [18]. A ISO 5492:1992 define a análise sensorial como “o exame dos atributos organoléticos de um produto através dos órgãos dos sentidos humanos” [63].

A prova do vinho deverá ser feita com o número significativo de provadores, dado que a avaliação da sua qualidade é bastante subjetiva, nomeadamente em relação ao aroma, ao gosto, ao sabor e à cor. A variabilidade na resposta sensorial é inerente a qualquer grupo de pessoas que

realizam a análise. No entanto, com treino, esse grupo pode apresentar respostas individuais consistentes, sendo importante fazer uma análise e um tratamento dos resultados obtidos [64].

Existem dois tipos de testes sensoriais: objetivos e subjetivos. Os testes subjetivos fornecem dados sobre a aceitabilidade e preferência dos vinhos. Os testes objetivos fornecem dados concretos sobre as propriedades do vinho, existindo duas classes de testes: testes de discriminação e testes descritivos. Os testes discriminativos servem para determinar se existem diferenças sensoriais entre as amostras dos vinhos; e os testes descritivos, permitem identificar os componentes ou parâmetros sensoriais e medem a intensidade em que os atributos são percebidos [65,66].

O exame organolético é composto por 3 etapas: exame visual, exame olfativo e exame gustativo. A prova consiste em observar o vinho em múltiplos aspectos e detetar os seus principais atributos positivos e negativos [27]. Geralmente a análise inicia-se com o exame visual, avaliando a tonalidade da cor e limpidez. Os estímulos visuais, muitas vezes dão uma sensação de prazer e/ou antecipação das sensações que vêm a seguir a este exame. A cor do vinho branco depende de vários fatores, como a maturação da uva, onde as uvas brancas pouco maduras produzem vinho quase incolores, e as uvas totalmente maduras produzem vinhos com uma cor amarelada mais intensa; o envelhecimento do vinho também afeta a cor. Assim, os vinhos brancos podem variar entre amarelo-claro (vinhos jovens), a dourado (vinhos envelhecidos). A limpidez num vinho pode ser definida como a ausência de partículas em suspensão. A maioria dos vinhos são límpidos, mas os que não foram filtrados após fermentação podem apresentar partículas em suspensão. Relativamente a este parâmetro, o vinho pode ser considerado desde muito turvo (geralmente indicador de uma fermentação mal realizada) a cristalino (a maior parte dos vinhos brancos entram nesta categoria) [26,27].

O segundo exame a ser realizado é o exame olfativo. O olfato permite determinar os odores do vinho, podendo estes serem agradáveis ou desagradáveis. As impressões olfativas são muito numerosas e apelam sobretudo à memória, o cheiro é sempre qualificado por uma referência [18]. A sensação olfativa do vinho não depende somente da concentração dos componentes voláteis, mas também da sua volatilidade e pressão de vapor. Assim, compostos que se encontram com elevadas concentrações podem não ser perceptíveis, em contrapartida, compostos presentes em concentrações na ordem ng/L podem contribuir de forma significativa para o aroma global do vinho [35].

O exame gustativo é o último sentido a ser usado na prova, em que se avalia o gosto e a sensação na boca. Na medida do possível, o volume da amostra dos diferentes vinhos deve ser mantido equivalente. As papilas gustativas, que se encontram na superfície da língua conseguem perceber os quatro gostos mais elementares: doce – pela presença dos açúcares residuais que não foram fermentados; ácido – pela presença dos provenientes da uva e os que foram produzidos durante a fermentação; salgado – advém dos sais minerais dissolvidos, como o cloreto de sódio; amargo – devido aos compostos fenólicos, como os taninos [26]. Para influenciar o sabor, a maior parte dos compostos têm de estar presentes em níveis de pelo menos 1 % do produto final [66].

Capítulo III – Materiais e Métodos

O trabalho experimental realizado e descrito na presente dissertação consistiu em avaliar a aptidão enológica de 11 estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, previamente selecionadas pela análise fenológica efetuada anteriormente pela empresa *Vinalia*. As fermentações foram realizadas à escala piloto, em fermentadores com uma capacidade máxima de 20 L, instalados na empresa *Yeast Wine – Wine Solutions* (Figura 15).



Figura 15 – Estação piloto constituída por 12 fermentadores, revestidos com uma camisa de arrefecimento cuja temperatura é controlada por um *chiller*.

Os comportamentos fermentativos das estirpes avaliadas foram comparados com o comportamento da estirpe comercial Lalvin QA23® (Lallemand). Dado que a estação é constituída por 12 fermentadores, realizaram-se duas séries de fermentação, sendo avaliadas 6 estirpes de cada vez, em duplicado.

Este capítulo da dissertação refere os métodos e os procedimentos adotados para a concretização do trabalho idealizado, sendo dividido em 5 partes: caracterização do mosto usado nas fermentações; preparação dos inóculos de leveduras; ensaios de fermentação alcoólica; análises físico-químicas dos vinhos; e análise sensorial dos vinhos.

3.1 Caraterização do mosto

No trabalho experimental foi utilizado mosto concentrado de uva branca distribuído pela empresa *Indumape – Industrialização de Fruta S.A.*, com as caraterísticas apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Especificações e resultados descritas no certificado de análise que vinha junto com o mosto concentrado de uvas brancas: *Brix*, concentração de SO₂ total ($C_{SO_2, total}$), pH, acidez total (*AT*), cor, contagem aeróbia total de unidades formadoras de colónias (*CAT*) e leveduras e bolores (*LB*)

Especificações						
<i>Brix</i> ¹	$\frac{C_{SO_2, total}}{mg/L}$	pH	$\frac{AT}{g/kg}$	Cor	$\frac{CAT}{g^{-1}}$	$\frac{LB}{g^{-1}}$
Refract. a 20 °C	<i>Brix</i> = 16	–	–	Abs _{430 nm} , <i>Brix</i> = 16	–	–
65 ± 1	< 10	2,6 a 4,8	4 a 20	0,10 a 0,40	< 1000	< 100
Resultados						
65,4	6,4	3,8	8	0,23	< 1000	< 100

Para a realização da primeira “série” das fermentações, o mosto foi diluído diretamente nos fermentados. Determinou-se a quantidade de mosto e de água a adicionar em cada fermentador, de modo a obter um valor médio de título alcoométrico volúmico provável de 12 %. O restante mosto concentrado foi armazenado para a sua futura utilização nas fermentações seguintes. Na segunda “série” das fermentações optou-se por diluir o mosto numa dorna com uma capacidade máxima de 250 L onde se acertou um valor de título alcoométrico volúmico provável de 12,5 %, com o auxílio de um refratómetro. Este mosto diluído foi homogeneizado, recorrendo a uma bomba de água (Figura 16) e depois distribuído pelas cubas, de forma a garantir uma concentração igual em todas.

Em ambas as séries, a massa volúmica e o álcool provável do mosto contido em cada fermentador foram determinados pela leitura num aerómetro, determinados por aerometria. Além dos parâmetros descritos, foram também determinados os valores da acidez total expressa em ácido tartárico (*AT*), o pH, a acidez volátil expressa em ácido acético (*AV*), o teor de sólidos solúveis totais (*SST* ou *Brix*), *Alpha amino Nitrogen (AAN)*, concentração de azoto

¹ *Brix* – corresponde à concentração mássica de sólidos solúveis, expressa em percentagem

amoniaco ($C_{\text{NH}_4^+}$), a massa volúmica (ρ), a concentração de ácido málico ($C_{\text{Ác.Málico}}$) e tartárico ($C_{\text{Ác.Tartárico}}$) pela tecnologia FTIR (equipamento OenoFoss™), utilizando o programa pré-definido “mosto”, sem qualquer tratamento prévio das amostras. De forma a complementar as análises do FTIR, foi congelada uma amostra do mosto da 2.ª série para análise por HPLC, relativamente à concentração de glucose (C_{glucose}), de frutose (C_{frutose}), do ácido tartárico ($C_{\text{Ác.Tartárico}}$), do ácido málico ($C_{\text{Ác.Málico}}$) e do ácido cítrico ($C_{\text{Ác.Cítrico}}$).



Figura 16 – Dorna de 250 L e a bomba de água utilizados para diluir o mosto para distribuir nas cubas.

Para se ter uma ideia aproximada dos açúcares fermentescíveis contidos no mosto multiplica-se o valor de *Brix* pela massa volúmica, Equação III.1.

$$\frac{C_{\text{açúcares}}}{\text{g/L}} = \frac{\text{Brix}}{100} \times \frac{\rho}{\text{g/L}} \quad \text{Equação III.1}$$

As amostras foram analisadas em triplicado, pelo que os resultados indicados no capítulo IV serão as médias obtidas com o respetivo erro associado, determinado a partir da Equação III.2, onde S_x representa o desvio padrão associado às amostras, t o valor tabelado de *t* de *student* com $(n-1)$ graus de liberdade, para o nível de confiança 95 %, e finalmente n é o número de réplicas analisadas para cada amostra

$$\Delta x_0 = t_{(n-1)} \times \frac{S_x}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação III.2}$$

As 11 estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho, designadas por Y3, Y4, Y5, Y6, Y8, Y10, Y12, Y14, Y15, Y17 e Y18, foram anteriormente isoladas e selecionadas pela empresa *Vinalia*. A estirpe comercial Lalvin QA23® (Lallemand) foi usada como padrão. Na primeira série de fermentações foram estudadas as leveduras designadas por Y3, Y4, Y5, Y6, Y8 e a estirpe

comercial Lalvin QA23®, pelo que na segunda série foram estudadas as estirpes designadas por Y10, Y12, Y14, Y15, Y17 e Y18.

3.2 Preparação dos inóculos de leveduras

Todos os materiais de vidro utilizados durante a preparação dos pré-inóculos e dos inóculos, foram esterilizados numa estufa a 180 °C durante 2 h. Foram preparados pré-inóculos e, depois, inóculos para adicionar aos fermentadores.

Preparação do pré-inóculo

Foi preparado o meio YPD líquido e colocado em frascos *Schott* de 400 mL (10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona bacteriana e 20 g/L de D-glucose; volume completado com água destilada). O meio foi depois autoclavado.

O pré-inóculo foi preparado assepticamente, numa câmara de fluxo laminar horizontal, a partir de culturas armazenadas em glicerol a 30 mL/L e mantidas a -80 °C. Colocou-se uma pequena quantidade do *pellet* de levedura, de cada estirpe, em tubos *Falcon* com 30 mL do meio YPD líquido. Os tubos do pré-inóculo foram, então, levados à estufa e mantidos a 30 °C por 72 h, tempo necessário para que houvesse crescimento adequado das células.

Preparação dos inóculos

Os inóculos foram efetuados em *Erlenmeyers*, cada um contendo 400 mL do meio de cultura YPD, descrito anteriormente. A cada *Erlenmeyer* foi adicionado, numa câmara de fluxo laminar horizontal, um volume de 1 mL do pré-inóculo. Incubou-se os inóculos num agitador rotativo a 200 min⁻¹, a 30 °C, por 24 h, de modo a atingir uma concentração celular para cada uma das estirpes de aproximadamente 1×10⁸ mL⁻¹ [67], ao qual corresponde uma densidade ótica de aproximadamente 0,7 a 620 nm, lido numa placa de poços com um volume de 100 µL.

Para cada par de fermentadores foi calculado e adicionado um determinado volume dos inóculos das diferentes estirpes, de modo a garantir uma cultura inicial semelhante para todos os fermentadores, numa concentração de aproximadamente 1×10⁶ mL⁻¹. A Tabela 4 estabelece a correlação entre a absorvência a 620 nm dos inóculos ($DO_{620\text{ nm}}$) e a concentração celular (n – número de células por unidade de volume) que foi estimada pela leitura da absorvência a

620 nm dos inóculos e o volume de suspensão celular de cada estirpe inoculadas em 20 L de mosto.

O volume a inocular no mosto, indicado na Tabela 4 para cada estirpe, foi transferido para tubos *Falcon*, que foram centrifugados durante 5 min, a 7000 min^{-1} e a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi descartado, e ressuspenderam-se as células com um pequeno volume do mosto. Por fim, foram inoculados no mosto presente nos fermentadores.

Tabela 4 – Correlação entre a absorvência média a 620 nm dos inóculos ($Abs_{620 \text{ nm}}$), a concentração celular (n – número de células por unidade de volume) e o volume de suspensão celular (V) de cada estirpe inoculadas em 20 L de mosto

	$Abs_{620 \text{ nm}}$	$\frac{n}{10^8 \text{ mL}^{-1}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$
Y3	0,824	1,18	170
Y4	0,914	1,31	155
Y5	0,840	1,20	170
Y6	0,991	1,42	150
Y8	0,867	1,24	170
Lalvin QA23®	0,864	1,23	170
Y10	1,046	1,49	135
Y12	0,978	1,40	145
Y14	1,075	1,54	130
Y15	1,064	1,52	135
Y17	0,916	1,31	155
Y18	0,907	1,30	155

3.3 Ensaios de fermentação alcoólica

No total foram realizadas 24 fermentações à escala piloto, tratando-se de duas fermentações para cada estirpe, de modo a garantir a robustez dos resultados. A temperatura dos fermentadores foi controlada por um *chiller* (Figura 17). A temperatura das camisas de arrefecimento foi fixada em $(18 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$.

Para determinar a massa volúmica foram recolhidos 200 mL do mosto em fermentação para uma proveta com uma capacidade máxima de 250 mL, a partir do fundo do fermentador, sendo a amostra reintroduzida a partir do cimo. O aerómetro era mergulhado no mosto em fermentação, e lia-se diretamente o valor da massa volúmica (Figura 17).



Figura 17 – Na esquerda o *chiller* que controlava as temperaturas das cubas e a imagem da direita o aerómetro mergulhado na proveta com uma amostra de um mosto e fermentação para ler a massa volúmica.

Além da massa volúmica obtida pela leitura do aerómetro, os valores da concentração de glucose e frutose ($C_{\text{glu+fru}}$) e o título alcoométrico volúmico (TAV) foram acompanhados, recorrendo ao equipamento OenoFoss™, utilizando o programa predefinido “mosto em fermentação”. Para tal, foram recolhidas amostras diariamente, colocadas em tubos *ependorf* que foram centrifugados durante 2 min a $14\,000\text{ min}^{-1}$ e depois analisadas. Os parâmetros foram analisados em quadruplicado, pelo que os resultados indicados no capítulo IV serão as médias obtidas com o respetivo erro associado, determinado a partir da Equação III.2. Ao longo da fermentação, ainda foi acompanhada a evolução da espuma e o aroma predominante foi registado, avaliado por duas conhecedoras do produto.

Quando a massa volúmica normalizou perto de valores e 995 kg/m^3 ou inferiores, as fermentações foram terminadas adicionando-se 3,2 g de metabissulfito de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$). A temperatura das camisas de arrefecimento dos fermentadores foi reduzida para $(8 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Fecharam-se as cubas, sendo isoladas todas as saídas/entradas de ar com *parafilm*.

O vinho permaneceu em repouso, com vista à sedimentação das leveduras e borras, durante 10 d a 12 d a $(8 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Posteriormente, os vinhos foram engarrafados, enchendo-se 3 garrafas de 0,75 L para cada cuba. Foram retiradas amostras para 2 tubos *Falcon*, para futura análise química dos vinhos por HPLC e por cromatografia gasosa. Todas as amostras destinadas à

análise por HPLC foram diluídas com água destilada num fator de 2, perfazendo um total de 50 mL. As amostras foram filtradas num *acrodisc* de 0,22 µm de porosidade e depois congeladas. Os vinhos foram depois conservados num ambiente com a temperatura controlada (aproximadamente 4° C) até ao dia da prova organolética.

3.4 Análises Físico-químicas dos vinhos

Os diferentes vinhos produzidos foram analisados relativamente ao teor de açúcar (glucose e frutose), etanol, glicerol e os ácidos orgânicos (tartárico, málico, cítrico e succínico), por HPLC. A acidez total, acidez volátil e o pH foram avaliadas por FTIR, utilizando o programa predefinido “vinho final” no OenoFoss™, sem qualquer tratamento prévio das amostras. Também foram quantificados por cromatografia gasosa os compostos voláteis minoritários (GC-MS) e os compostos voláteis maioritários (GC-FID).

Relativamente às análises por HPLC e por GC, dado que foram feitas no Departamento e no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (DEB e CEB), respetivamente, as amostras dos vinhos retiradas no final do repouso foram congeladas até ao dia da análise.

3.4.1 Doseamento de açúcares, ácidos, glicerol e etanol por HPLC

Para complementar os resultados obtidos por FTIR fez-se a quantificação por HPLC dos ácidos orgânicos (cítrico, tartárico, málico e succínico), dos açúcares (glucose e frutose), do glicerol e do etanol dos vinhos finais.

Foi usado um sistema HPLC, no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Figura 18), constituído por um sistema constituído por uma coluna *organic acids Chrompack* (300 mm × 6,5 mm), uma bomba Jasco 880-PU, um detetor de índice de refração RI Jasco 830-RI, um detetor UV/vis. Foi utilizado o H₂SO₄ a 5 mmol/L como eluente, a um caudal 0,30 mL/min, uma temperatura do forno de 80 °C, e um *loop* de 20 µL para injeção da amostra, efetuando-se a quantificação pelo método do padrão externo. Os ácidos orgânicos foram detetados por espectrofotometria a 210 nm e os açúcares, glicerol e etanol por refratometria. A aquisição e tratamento dos dados foi realizada pelo *software Star – Chromatography Workstation* versão 6.30 (*Varian*).



Figura 18 – Sistema de Cromatografia de Líquidos (HPLC), usado para a quantificação da glucose, da frutose, do etanol, do glicerol, do ácido málico, do ácido cítrico, do ácido tartárico e do ácido succínico.

As amostras foram descongeladas apenas no dia da análise, sendo injetadas em seguida em duplicado, pelo que os resultados indicados no capítulo IV serão as médias obtidas com o respetivo erro associado. O erro associado à concentração desconhecida foi determinado através de uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (no *Microsoft Excel*), e à Equação III.3:

$$\Delta x_0 = t_{(n-2)} \times S_{x_0} \quad \text{Equação III.3}$$

Na equação S_{x_0} representa o desvio padrão associado à determinação da concentração desconhecida, t o valor tabelado de t de *student* com $(n - 2)$ graus de liberdade, para o nível de confiança 95 %. Para S_{x_0} calcular o valor de recorreu-se à Equação III.4:

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{a} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{a^2 \sum_i (x_0 - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação III.4}$$

Na equação, $S_{y/x}$ representa o erro padrão da regressão, n o número de ponto da curva de calibração, m o número de repetições na leitura da amostra, y_0 o valor médio do sinal da amostra, x_0 a concentração média da amostra e a o valor do declive da reta de calibração.

3.4.2 Doseamento da acidez total e do pH por FTIR

A acidez total e o pH dos vinhos foram analisados recorrendo à tecnologia FTIR (equipamento OenoFoss™), Figura 19, usando o *software Foss Integrator Analyser*. Colocou-se uma amostra de aproximadamente 600 μL , sem qualquer tratamento prévio, obtendo-se os resultados 2 min depois.

O equipamento já estava calibrado e foi usado para analisar o vinho final recorrendo ao programa predefinido “vinho”. Esta tecnologia também foi utilizada para analisar o mosto, recorrendo ao programa “mosto” e para analisar o mosto em fermentação utilizando o programa “mosto em fermentação”. As amostras dos vinhos e do mosto não sofreram qualquer tratamento prévio, em contrapartida, as amostras do mosto em fermentação, colocadas em *ependorfs*, foram centrifugadas (2 min, 14 000 min⁻¹) antes da respetiva análise.

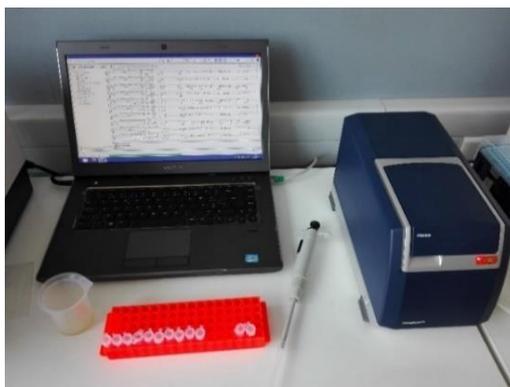


Figura 19 – Equipamento OenoFoss™ acoplado a um computador com o software adequado para a análise das amostras.

3.4.3 Doseamento dos compostos voláteis por cromatografia gasosa

As análises dos compostos voláteis maioritários foram efetuadas por GC-FID (cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama) e os compostos voláteis minoritários do aroma foram efetuadas por GC-MS (cromatografia gasosa com espetrometria de massa). As amostras foram analisadas em duplicado, os resultados indicados no capítulo IV serão as médias obtidas associadas ao respetivo desvio-padrão.

Compostos voláteis minoritários

A extração dos compostos voláteis minoritários das amostras dos vinhos foi feita de acordo com o método descrito por Oliveira *et al.* (2006) [68]. A quantificação dos mesmos foi feita com base no método descrito por Genisheva *et al.* (2014) [69]. Contudo, na etapa de extração foi necessário repetir alguns procedimentos.

As amostras dos vinhos foram centrifugadas a 7 000 min⁻¹, a 4 °C durante 5 min e depois congeladas. Só foram descongeladas no próprio dia das análises num banho de água fria. Transferiram-se 8 mL da amostra descongelada para um tubo de cultura (Pyrex, ref. 1

636/26MP), adicionou-se 100 µL de uma solução de padrão interno (4-nonanol – *Merck* ref. 818 773; 24,012 mg/L, em etanol absoluto) e colocou-se uma barra de agitação magnética (22,2 mm × 4,8 mm). A extração foi feita com 400 µL de diclorometano (*Merck* ref. 1.065054), sob agitação magnética, durante 15 min. De seguida a mistura foi arrefecida a 0 °C durante 10 min. A barra magnética foi retirada e a amostra foi centrifugada (2 600 min⁻¹, 7 min, 4 °C), separando a fase orgânica. As amostras foram novamente arrefecidas a 0 °C durante 10 min e centrifugadas (2 500 min⁻¹, 10 min, 4 °C). O extrato aromático foi recolhido com uma pipeta de *Pasteur* para um *vial* e desidratado com sulfato de sódio anidro (em excesso) e, depois, transferido para um novo *vial*. As amostras foram mantidas a –20 °C até ao momento da análise.

Os extratos dos vinhos foram analisados utilizando um sistema GC-MS *Varian Saturn 2 000* equipado com injetor 1 079 e detetor de massas *ion-trap* (IT-MS) e uma coluna *Sapiens-Wax MS Teknokroma* (30 m × 0,15 mm; espessura de filme = 0,15 µm). O detetor (IT-MS) foi usado em modo de impacto eletrónico, com uma energia de ionização de 70 eV e uma gama de aquisição de massas entre 35 m/z a 300 m/z, adquirindo em intervalos de 610 ms. A coluna foi programada para manter 60 °C nos primeiros 2 min, elevando 3° C/min até atingir os 234 °C. Atingidos os 234 °C, subiu 5 °C/min até atingir os 260 °C, onde permaneceu por 5 min. As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram mantidas a 250 °C.

O gás de transporte foi o hélio GHE4x (*Praxair*), com um caudal constante de 1,3 mL/min. Foi injetado 1 µL de cada extrato em modo *Splitless* (durante 30 s), tendo uma razão de *split* de 30 mL/min.

A quantificação foi feita pela *software Star – Chromatography Workstation* versão 6.9.3. (*Varian*). A quantificação (análise semiquantitativa) dos compostos voláteis foi feita por comparação entre os índices de retenção com os de compostos de referência puros, neste caso todos os compostos foram equivalentes ao 4-nonanol. Através do cromatograma foram selecionados os compostos que se consideraram de maior interesse. A quantificação desses compostos voláteis minoritários nas amostras de vinho foi determinada utilizando o método do padrão interno, Equação III.5.

$$C_c = C_{pi} \times \frac{A_c}{A_{pi}} \times F \quad \text{Equação III.5}$$

A variável A_c representa a área do composto a analisar, A_{pi} a área do padrão interno utilizado, C_c a concentração do composto e C_{pi} a concentração do padrão interno e F representa

os fatores de correção de cada composto volátil nas amostras em relação ao 4-nonanol. Para todos os compostos voláteis minoritários foi usado o valor de F igual a 1.

Compostos voláteis majoritários

O doseamento dos compostos voláteis minoritários das amostras dos vinhos foi feito de acordo com o método descrito por Oliveira *et al.* (2006) [68] e a sua quantificação foi feita com base no método descrito por Duarte *et al.* (2010) [70].

As amostras dos vinhos foram centrifugadas a $7\ 000\ \text{min}^{-1}$, a $4\ ^\circ\text{C}$ durante 5 min e depois congeladas. Só foram descongeladas no próprio dia das análises num banho de água fria. As amostras foram analisadas diretamente por GC-FID. Mediram-se 5 mL da amostra descongelada e adicionaram-se 100 μL de uma solução de padrão interno (4-nonanol – Merck ref. 818 773; 3 g/L, em etanol absoluto) num tubo de vidro. As amostras foram mantidas a $4\ ^\circ\text{C}$ até ao momento da análise.

Foi utilizado um cromatógrafo Chrompack CP9000 equipado com injetor *split/splitless*, um detetor de ionização de chama e uma coluna Meta-Wax Teknokroma ($30\ \text{m} \times 0,25\ \text{mm}$; espessura de filme = $0,2\ \mu\text{m}$). A coluna foi programada para manter $50\ ^\circ\text{C}$ nos primeiros 2 min, elevando $5^\circ\ \text{C}/\text{min}$ até atingir os $177,5\ ^\circ\text{C}$. Atingidos os $177,5\ ^\circ\text{C}$ subiu $10\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ até atingir os $230\ ^\circ\text{C}$, onde permaneceu por 15 min. As temperaturas do injetor e do detetor foram mantidas a $250\ ^\circ\text{C}$, sendo a razão de *split* de 15 mL/min. O gás de transporte foi o hélio GHE4x (Praxair), com um caudal inicial de 1 mL/min ($75\ \text{kPa}$ à cabeça da coluna). Foi injetado 1 μL de cada amostra.

A quantificação foi feita pela *software Star – Chromatography Workstation* versão 6.9.3. (Varian). A quantificação (análise quantitativa) dos compostos voláteis foi feita por comparação entre os índices de retenção com os de compostos de referência puros. A concentração dos compostos voláteis majoritários nas amostras de vinho foi determinada utilizando o método do padrão interno, Equação III.5. Neste caso, os valores de F já tomaram valores próprios para cada componente.

3.5 Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada às 11 h numa sala preparada para o efeito, localizada no edifício IEMinho, por um conjunto de 5 conhecedores do produto, 3 do género feminino e 2 do

género masculino. A sala, bem iluminada, não apresentava odores anormais. A temperatura da sala foi de (20 ± 1) °C, o vinho foi servido a uma temperatura aproximada de 10 °C.

A prova consistiu na avaliação dos 24 vinhos brancos produzidos (12 estirpes, em duplicado). Cada conhecedor do produto tinha acesso a 24 copos marcados, específicos para a prova de vinhos, e a uma ficha de prova, Figura 20, cujos atributos em análise foram:

- i. Exame Visual: Limpidez e Cor;
- ii. Exame Olfativo: Intensidade, Floral, Frutado, Fruto seco, Mineral, Vegetal e Impressão geral;
- iii. Exame Gustativo: Doçura, Acidez, Amargor, Equilíbrio, Persistência e Impressão geral.
- iv. Apreciação global

Cada descritor foi avaliado numa escala de 0 a 5, exceto a apreciação global cuja escala foi de 0 a 20. Os descritores olfativos da ficha de prova foram selecionados e simplificados de entre os mais comuns para os vinhos brancos.

Os resultados da análise sensorial foram tratados estatisticamente de forma a quantificar e facilitar a visualização das sensações captadas. Os resultados apresentados no Capítulo IV, representam a mediana das classificações dos provadores. Optou-se por usar as medianas e não as médias dos resultados, dado que foram apresentados valores discrepantes, e somente a mediana traduziria a tendência das avaliações dos provadores.

FICHA DE PROVA DESCRITIVA – brancos

EXAME VISUAL		Provador:
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)

Excelente	Muito Bom		Bom		Suficiente	Médocre		Mau		
20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	0

Figura 20 – Ficha de prova descritiva simplificada para vinhos brancos.

Capítulo IV – Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos ao longo do trabalho realizado e a discussão dos mesmos. Para uma melhor interpretação dos resultados e facilidade de leitura, optou-se pela divisão dos tópicos avaliados e discutidos em 4 partes: caracterização do mosto usado nas fermentações; monitorização da fermentação alcoólica; caracterização físico-químicas dos vinhos; e caracterização sensorial dos vinhos.

4.1 Caracterização do mosto usado nas fermentações

Segundo o Regulamento (CE) N.º 479/2008 [3], o mosto é o produto líquido obtido naturalmente ou por processos físicos a partir de uvas frescas, que após a fermentação se transforma no vinho. O mosto concentrado, por sua vez, entende-se como o mosto de uvas não caramelizado obtido por desidratação parcial de mosto de uvas, efetuada por qualquer método autorizado. Assim, como já referido no Ponto 2.1.2 (Capítulo II), o mosto de uva, em condições normais, é altamente fermentescível, e contém todas as substâncias para assegurar o metabolismo e as funções vitais das leveduras [18]. O resultado da fermentação depende de muitos fatores, particularmente da quantidade e qualidade dos nutrientes presentes no mosto. O mosto contém hidratos de carbono (*e.g.* glucose e frutose) usados como fonte de energia e carbono, ácidos orgânicos (*e.g.* tartárico e málico), catiões minerais (*e.g.* fosfato, sulfato, magnésio, cálcio, potássio). Contém ainda vitaminas, lípidos (fitoesteróis) e compostos azotados, que podem estar presentes em diferentes formas: azoto amoniacal, polipéptidos, proteínas e aminoácidos [15,71].

Como referido no Ponto 3.1 (Capítulo III) o mosto foi inicialmente diluído para os 12 fermentadores, para a realização da primeira série das fermentações, tentando um título alcoométrico volúmico provável próximo de 12 %. Na segunda série optou-se por diluir o mosto numa dorna de 250 L, sendo que neste caso todos os fermentadores possuíam um mosto diluído com as mesmas características.

Relativamente à primeira série das fermentações, a massa volúmica e o álcool provável do mosto contido em cada fermentador, foram determinados pela leitura num aerómetro. Os resultados estão apresentados na Tabela 5. Na segunda série de fermentações, estes valores

foram analisados diretamente na dorna, e este mosto foi distribuído diretamente para os fermentadores, com as mesmas características em todas as cubas. O valor médio da massa volúmica e do álcool provável médio encontram-se na Tabela 5, com o indicativo “dorna”.

Tabela 5 – Valores médios da massa volúmica (ρ) e álcool provável, em volume (AP_{aer}) do mosto contido nos fermentadores onde se inocularam as estirpes indicadas e na dorna, lidos no aerómetro

Estirpe	$\frac{\rho}{\text{kg/m}^3}$	$\frac{AP_{aer}}{\%}$
Y3	1 085	10,5
Y4	1 088	11,9
Y5	1 082	10,9
Y6	1 090	12,4
Y8	1 092	12,7
Lalvin QA23®	1 090	12,2
Dorna	1 091	12,6

O mosto é um líquido turvo, ligeiramente colorido, com uma massa volúmica elevada devido às muitas substâncias químicas que ele contém, essencialmente açúcares. Pela análise da Tabela 5, os valores da massa volúmica encontram-se compreendidos entre 1 082 kg/m³ e 1 092 kg/m³, estando assim dentro dos limites encontrados na bibliografia, que remetem para valores, no mosto, compreendidos entre 1 070 kg/m³ e 1 120 kg/m³ [4,18]. Os valores de álcool provável, contudo, são meramente indicativos, sendo esperado um título alcoométrico volúmico adquirido (TAV) inferior ao indicado na Tabela 5. Esta afirmação centra-se no facto de que o mosto, apesar de ser rico em açúcares fermentescíveis, é também composto por outros açúcares não fermentescíveis e por isso não convertidos em etanol, além da presença de outros sólidos dissolvidos que não são açúcares. Todos estes fatores influenciam na determinação do álcool provável (AP_{aer}), dado que quanto maior a presença de sólidos solúveis no mosto maior será a massa volúmica e, assim também maior será valor do AP_{aer} . Além disso, pode também haver evaporação do etanol formado e/ou ser metabolizado no final da fermentação, diminuindo os valores de TAV .

Além dos parâmetros descritos na Tabela 5, foram também determinados outros parâmetros físico-químicos por FTIR, utilizando o programa pré-definido “mosto”, sendo também calculada a concentração de açúcares disponíveis em cada fermentador. Todos os resultados, relativamente à 1.ª série das fermentações encontram-se apresentados na Tabela 6. Contudo, no caso das fermentações da 2.ª série analisou-se o mosto também por HPLC, relativamente às hexoses e ácidos orgânicos. A Tabela 7 expõe a caracterização do mosto por FTIR e por HPLC.

Tabela 6 – Valores dos principais parâmetros físico-químicos: sólidos solúveis totais (*SST*), acidez total (*AT*), pH, acidez volátil (*AV*), concentração do azoto amoniacal ($C_{\text{NH}_4^+}$), azoto com grupo alfa-amino (*ANN*), massa volúmica (ρ), concentração do ácido málico ($C_{\text{Ac.Málico}}$), concentração do ácido tartárico ($C_{\text{Ac.Tartárico}}$) e concentração de açúcares ($C_{\text{açúcares}}$), com os respetivos erros associados ($p=0,05$), obtidos pela análise por FTIR, relativamente ao mosto diluído em cada fermentador (1.ª série)

	Y3	Y4	Y5	Y6	Y8	QA23*
$\frac{SST^*}{\%}$	19,1 ± 0,7	20,7 ± 0,4	18,5 ± 0,2	20,2 ± 0,1	20,7 ± 0,5	20,7 ± 0,7
$\frac{AT}{\text{g/L}}$	1,8	1,9 ± 0,1	1,8	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0
pH	3,69 ± 0,01	3,69 ± 0,01	3,67 ± 0,01	3,70 ± 0,04	3,71 ± 0,02	3,71 ± 0,01
$\frac{AV}{\text{g/L}}$	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,08 ± 0,05	0,08 ± 0,01
$\frac{C_{\text{NH}_4^+}}{\text{mg/L}}$	188,2 ± 10,7	187,4 ± 16,9	179,9 ± 6,3	185,7 ± 13,5	189,0 ± 21,6	181,8 ± 9,8
$\frac{ANN}{\text{mg/L}}$	159,4 ± 19,8	159,6 ± 5,1	146,6 ± 18,1	147,2 ± 10,3	146,8 ± 8,6	155,5 ± 19,1
$\frac{\rho}{\text{g/mL}}$	1,083 ± 0,004	1,089 ± 0,004	1,081 ± 0,001	1,088 ± 0,007	1,091 ± 0,007	1,091 ± 0,002
$\frac{C_{\text{Ac.Málico}}}{\text{g/L}}$	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,1	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,1
$\frac{C_{\text{Ac.Tartárico}}}{\text{g/L}}$	4,6 ± 1,1	4,4 ± 0,7	3,8 ± 0,5	4,2 ± 0,2	4,1 ± 0,1	4,7 ± 0,2
$\frac{C_{\text{açúcares}}}{\text{g/L}}$	206,4 ± 8,4	225,6 ± 5,2	200,0 ± 2,8	219,3 ± 3,0	226,3 ± 7,0	226,7 ± 1,8

* *SST* – Corresponde à concentração mássica de sólidos solúveis totais, expressa em percentagem

Tabela 7 – Valores dos principais parâmetros físico-químicos: SST , AT , pH , AV , $C_{NH_4^+}$, ANN , ρ e $C_{açúcares}$ obtidos pela análise por FTIR; $C_{Ac.Málico}$, $C_{Ac.Tartárico}$, $C_{Ac.Citríco}$, $C_{glucose}$ e $C_{frutose}$ por HPLC, com os respetivos erros associados ($\rho = 0,05$), relativamente ao mosto diluído na dorna (2.ª série)

FTIR							
$\frac{SST}{\%}$	$\frac{AT}{g/L}$	pH	$\frac{AV}{g/L}$	$\frac{C_{NH_4^+}}{mg/L}$	$\frac{ANN}{mg/L}$	$\frac{\rho}{g/mL}$	$\frac{C_{açúcares}}{g/L}$
21,3 ± 0,5	2,1 ± 0,3	3,69 ± 0,01	0,07 ± 0,04	179,3 ± 18,3	148,7 ± 30,9	1,089 ± 0,003	232,2 ± 5,6
HPLC							
Hexoses			Ácidos Orgânicos				
$\frac{C_{glucose}}{g/L}$	$\frac{C_{frutose}}{g/L}$		$\frac{C_{Ac.Málico}}{g/L}$	$\frac{C_{Ac.Tartárico}}{g/L}$	$\frac{C_{Ac.Citríco}}{g/L}$		
88,9 ± 3,5	121,3 ± 6,2		2,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1		

SST – sólidos solúveis totais; AT – acidez total; AV – acidez volátil; $C_{NH_4^+}$ – concentração de azoto amoniacal; ANN – azoto com grupo alfa-amino; ρ – massa volúmica; $C_{açúcares}$ – concentração de açúcares; $C_{Ac.Málico}$ – concentração do ácido málico; $C_{Ac.Tartárico}$ – concentração do ácido tartárico; $C_{Ac.Citríco}$ – concentração do ácido citríco; $C_{glucose}$ – concentração de glucose; $C_{frutose}$ – concentração de frutose

O teor de sólidos totais (SST) é a variável que representa a concentração de açúcar no mosto de uvas, sendo a glucose e a frutose os açúcares mais importantes encontrados nas uvas [34].

Como já mencionado no Ponto 3.1 (Capítulo III), os valores de sólidos solúveis totais e da massa volúmica (ρ) estão estritamente relacionados, assim como com os valores da concentração de açúcares fermentescíveis. O valor de ρ será tanto maior quanto maior o teor de SST , dado que existe uma maior quantidade de compostos dissolvidos. Por sua vez, através da Equação III.1, que envolve o valor de SST obtém-se o valor de $C_{açúcares}$. Assim, relativamente aos valores de $C_{açúcares}$ apresentados nas Tabelas 6 e 7, todos os valores obtidos encontram-se dentro dos valores normais, dado que para mostos de uvas maduras obtém-se geralmente concentrações de açúcares fermentescíveis bastante elevadas, entre 150 g/L e 240 g/L [15].

Ainda relacionado com a concentração de açúcares, analisou-se por HPLC o mosto da 2.ª série, como mencionado anteriormente. Nessa análise determinou-se a concentração de glucose ($C_{glucose}$) e a concentração de frutose ($C_{frutose}$) presente no mosto, dado estes serem os principais açúcares presentes. Verifica-se na Tabela 7 que a concentração de frutose é superior à

concentração de glucose. A frutose é sempre predominante em relação à glucose, sendo normalmente apresentada uma a relação glucose/frutose de cerca de 0,9 no mosto [15]. Apesar de a glucose e a frutose estarem em maior quantidade no mosto, estão presentes, em valor residual, outros açúcares como as pentoses xilose e arabinose, que não são fermentescíveis [35].

Do metabolismo da glucose e da frutose são formados sobretudo etanol e CO_2 , havendo também a formação de outros componentes em menores quantidades, mas com uma importante função no vinho, nomeadamente glicerol, álcoois superiores, ácidos orgânicos e seus ésteres e, em menor extensão, aldeídos [35].

O azoto é um nutriente muito importante, sendo que a disponibilidade deste no mosto está diretamente associada à produção de biomassa, que regula a taxa de fermentação e a produção de compostos voláteis. Consequentemente, uma deficiente concentração deste nutriente pode levar à paralisação da fermentação e/ou afetar o equilíbrio aromático. Os aminoácidos, o azoto amoniacal ($\text{C}_{\text{NH}_4^+}$), os polipéptidos e as proteínas são algumas das fontes de azoto presentes no mosto, contudo, somente o azoto amoniacal e os aminoácidos são assimiláveis como fontes de azoto pela levedura [71]. Segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) [15], quando a concentração de $\text{C}_{\text{NH}_4^+}$ é inferior a 25 mg/L torna-se necessário suplementar o mosto, para impedir que exista uma interrupção da fermentação. Relativamente a este parâmetro, encontraram-se valores compreendidos entre 179,3 mg/L e 189,0 mg/L, podendo-se afirmar que não existem limitações relativamente a este nutriente.

O parâmetro *AAV* representa o teor aminoácidos primários facilmente assimiláveis pela levedura. Nas Tabelas 6 e 7 encontram-se valores compreendidos entre 146,6 mg/L e 159,6 mg/L. Considera-se que são necessários aproximadamente 300 mg/L de azoto assimilável para otimizar a cinética de fermentação alcoólica [71]. Se se somar o valor mínimo encontrado de $\text{C}_{\text{NH}_4^+}$ e de *AAV* obtém-se um valor de 326,5 mg/L, concluindo que não existe, em nenhum fermentador, limitação nutricional relativamente ao azoto assimilável. Além disso, estudos indicam que um teor de azoto facilmente assimilável no mosto de aproximadamente 320 mg/L, resulta em vinhos com uma menor concentração de álcoois superiores e um melhor balanço de ésteres, concluindo-se assim que todas as cubas apresentam um valor de azoto assimilável superior ao ideal para o aroma do vinho [72].

A acidez volátil, compreende um grupo de ácidos que são facilmente removidos por destilação a vapor, sendo normalmente expressa em ácido acético, por este ser o mais abundante deste grupo, constituindo cerca de 90 % [20]. Este ácido é formado durante a fermentação alcoólica, podendo estar presente no mosto por deterioração das uvas infetadas, destacando-se as bactérias dos géneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*, as quais podem agir simultaneamente com o fungo *Botrytis cinerea* [73]. Os valores de *AV* apresentados nas Tabelas 6 e 7 são bastante reduzidos atingindo um valor máximo de 0,08 g/L.

A acidez total corresponde à acidez titulável, do mosto ou do vinho, representando a soma de todos os ácidos presentes [31]. A acidez total é geralmente expressa em ácido tartárico por este ser o mais representativo. A acidez do mosto está muito dependente da região, do grau de maturação das uvas e do clima, pelo que o valor pode variar bastante [31]. Nas Tabelas 6 e 7 observa-se que os valores de *AT* são bastante reduzidos, variando entre 1,8 g/L e 2,1 g/L.

O ácido tartárico, é um ácido forte que afeta diretamente o valor do pH [4]. O seu valor pode chegar a valores de 15 g/L no fim do crescimento vegetativo das uvas, contudo este teor decai durante o período de maturação. Os mostos obtidos a partir de castas plantadas no Norte de Portugal podem ter valores frequentemente acima de 6 g/L, enquanto que mais a Sul, a concentração de ácido tartárico situa-se abaixo de 2 g/L a 3 g/L. Quanto mais alta a temperatura do meio maior é a degradação do ácido durante a maturação da uva [74]. Na Tabela 6 verifica-se que os valores da concentração de ácido tartárico variam entre 3,8 e 4,7. Na Tabela 7, a concentração deste ácido é de 1,4 g/L. Este valor é bastante reduzido comparativamente com os valores da Tabela 6, mas pode dever-se ao facto de a amostra ter sido congelada para analisar por HPLC, enquanto que as outras amostras foram lidas diretamente. Por este motivo, pode ter havido perda de ácido tartárico devido à sua precipitação em sais de tartarato.

Relativamente ao ácido málico, este é, juntamente com o ácido tartárico um dos principais ácidos orgânicos. Ao contrário do anterior, este encontra-se presente em todos os organismos vivos, incluindo, a videira. No entanto, o seu valor diminui à medida que as uvas amadurecem, especialmente em condições de temperaturas elevadas [4]. Assim, a concentração deste ácido está diretamente relacionada com o clima do local onde as vinhas estão localizadas, sendo que em regiões mais frias existe uma tendência para concentrações mais elevadas [31]. Em uvas verdes a sua concentração pode atingir valores de 25 g/L, diminuindo ao longo da maturação do fruto. Em mostos provenientes de vinhas localizadas nas regiões vitivinícolas do

Norte encontram-se, geralmente, concentrações deste ácido compreendidas entre 4 g/L e 6,5 g/L, enquanto em regiões do Sul de Portugal se situa entre 1 g/L e 2 g/L [74]. Pela análise das Tabelas 6 e 7 constata-se que a concentração do ácido málico se encontra entre 2,0 g/L e 2,3 g/L.

Só foi possível quantificado o ácido cítrico por HPLC, desse modo este parâmetro só está associado ao mosto da 2.ª série de fermentações, Tabela 7. Este ácido, juntamente com os anteriores, representam os principais ácidos orgânicos presentes na uva, contribuindo para a acidez fixa, sendo que dos três (málico, tartárico e cítrico), é o menor representante, tal como se verifica na Tabela 7.

O pH do mosto apresentou valores compreendidos entre 3,67 e 3,71, valores mais elevados aos expectáveis. Segundo Ribéreau-Gayon [15] o pH do mosto encontra-se entre 2,8 e 3,5.

4.2 Monitorização da Fermentação alcoólica

Para um controlo eficaz da fermentação, foi necessário medir, duas vezes ao dia a massa volúmica e verificar a temperatura do mosto em fermentação. A medição da massa volúmica do mosto é essencial visto que a ocorrência da fermentação se verifica pela sua diminuição ao longo do tempo, devido à transformação dos açúcares em etanol e CO₂. A massa volúmica constitui uma medida aproximada da quantidade de açúcar presente no mosto, permitindo avaliar o progresso da fermentação. Este parâmetro permite assim, de uma forma indireta, seguir a fermentação, através da diminuição do seu valor. A massa volúmica do mosto está, geralmente, compreendida entre 1 070 kg/m³ a 1 120 kg/m³ e a do vinho entre 990 kg/m³ e 998 kg/m³. Geralmente, quanto a massa volúmica normaliza perto de 998 kg/m³ ou em valores inferiores, conclui-se que a fermentação alcoólica está completa [4,18].

A Figura 21 representa graficamente a variação da massa volúmica média ao longo dos dias, relativamente à estirpe Y3. As outras estirpes apresentam um comportamento semelhante, cujos gráficos podem ser visualizados na Figura A.1 (Anexo A).

Observa-se, pela Figura 21, que nas primeiras 24 h o consumo de açúcar não foi muito acentuado, dado que o valor da massa volúmica diminuiu ligeiramente. Uma vez que se pretendia obter um vinho seco, ou seja, uma baixa concentração de açúcares residuais, deixou-se a massa

volúmica atingir um valor igual a 995 kg/m^3 . Nessa altura adicionou-se metabissulfito de potássio e diminuiu-se a temperatura das camisas de arrefecimento das cubas, dando como terminada a fermentação. Todas as estirpes conseguiram atingir um valor de massa volúmica igual a 995 kg/m^3 , altura em que a fermentação alcoólica foi dada como terminada e interrompida.

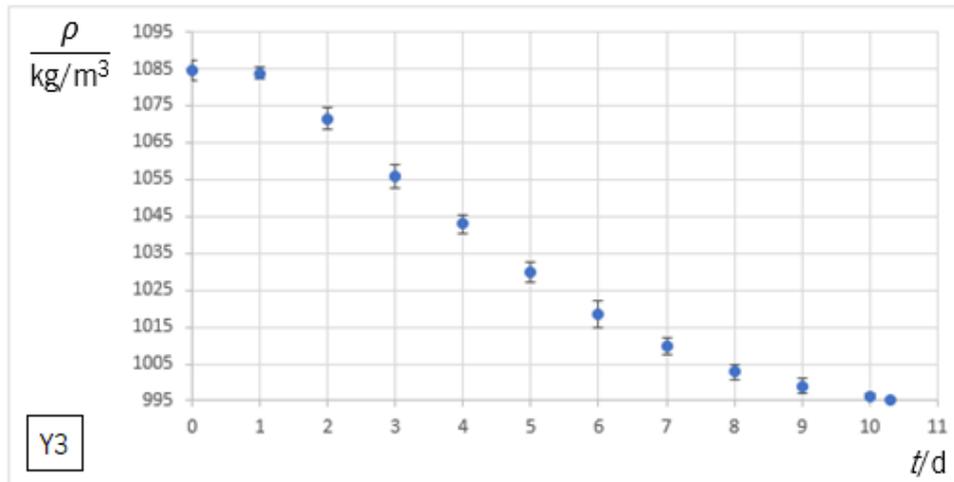


Figura 21 – Perfil da variação da massa volúmica (ρ) ao longo do tempo (t), associado ao respetivo erro ($p = 0,05$), – Estirpe Y3.

Como era esperado, o tempo que cada estirpe em estudo levou até atingir uma massa volúmica igual a 995 kg/m^3 variou. A primeira estirpe a atingir esse valor foi a Lalvin QA23®, demorando aproximadamente 8 d, seguida da estirpe Y14 que demorou mais 16 h (Figura A.1 – Anexo A). É possível enumerar as estirpes segundo a sua cinética de fermentação, assim da menos à mais demorada seguem a estirpe comercial Lalvin QA23®, Y14, Y6, Y8, Y3, Y4, Y10, Y5, Y18, Y15, Y17 e Y12, onde o tempo de fermentação está compreendido no intervalo de 8 d a 15 d. A estirpe Y12 teve uma descida de massa volúmica semelhante às restantes estirpes, acompanhando a sua cinética de fermentação até atingir um valor de massa volúmica igual a $1\ 000 \text{ kg/m}^3$. A partir desse ponto, e até ao finalizar da fermentação alcoólica, a sua diminuição deu-se de modo extremamente lento.

Apesar de a cinética de fermentação poder ser monitorizada somente pela verificação da descida da massa volúmica, é interessante complementar o estudo introduzindo os gráficos do consumo de glucose e frutose e do conseqüente aumento do valor de TAV ao longo do tempo. O gráfico da Figura 22 mostra a variação da concentração de glucose + frutose e de TAV ao longo tempo da fermentação alcoólica. Esta Figura 22 apresenta o percurso metabólico da estirpe Y3,

sendo os gráficos de cada uma das estirpes avaliadas, bastante semelhantes e podem ser encontrados na Figura A.2 (Anexo A).

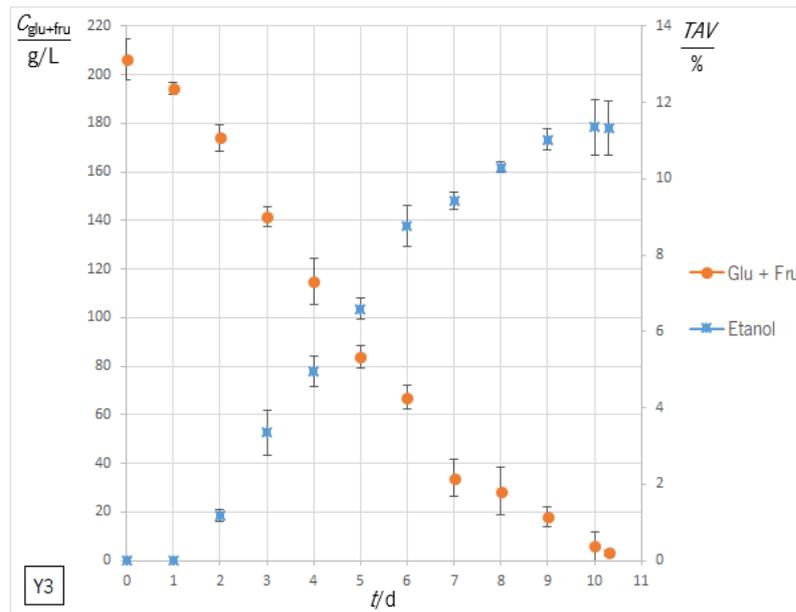


Figura 22 – Variação da concentração de glicose + frutose ($C_{glu+fru}$) e do título alcoométrico volúmico (TAV), quantificado por FTIR, em função do tempo de fermentação (t), associado ao respetivo erro ($p = 0,05$) – Estirpe Y3.

Através da análise da Figura 22, observa-se que a concentração dos açúcares fermentescíveis diminuiu e que o valor de TAV aumentou ao longo do tempo. Tal era previsível, visto que as leveduras do género *Saccharomyces* são reconhecidas por utilizarem açúcares como substrato, resultando na produção de etanol como produto final da fermentação alcoólica [75]. De realçar que a variação da concentração dos açúcares fermentescíveis no mosto segue uma tendência semelhante à variação da massa volúmica apresentada na Figura 21, tal como era esperado, dado que estes dois parâmetros estão relacionados.

Verifica-se ainda que nos primeiros dias de fermentação existiu um aumento do valor de TAV acentuado, relacionada com a fase exponencial de crescimento das leveduras. Assim, o aumento de TAV foi máximo durante esse período de tempo, e diminuiu progressivamente à medida que se esgotava o substrato, a glicose e a frutose. Ainda, se verifica que TAV nos últimos três dias, se manteve aproximadamente constante, já que todo o substrato estava praticamente consumido.

Ao longo da fermentação foram encontradas algumas diferenças a nível de aroma e formação de espuma, relativamente a cada estirpe. Dado que o objetivo era avaliar o

comportamento fermentativo das leveduras, foi registada a variação destes dois fatores ao longo do tempo. Assim, relativamente à variação dos aromas:

- **Estirpe Y3:** No início da fermentação apresentava um aroma floral, no entanto, a partir do 4.º dia começou a destacar-se o aroma frutado. Inicialmente lembrava fruta tropical, mas a partir do 7.º dia não era mais perceptível, tomando lugar o aroma a melão que se manteve até ao final da fermentação;
- **Estirpe Y4:** No início da fermentação apresentava um aroma desagradável, lembrando xixi de gato, contudo este aroma foi desaparecendo ao final do 4.º dia de fermentação, dando lugar ao aroma a toranja que se manteve até ao 7.º dia de fermentação. A partir dessa altura, o aroma a fruta tropical destacava-se, realçando o aroma a maracujá. No último dia de fermentação sentiu-se um leve aroma vegetal;
- **Estirpe Y5:** O mosto apresentava um aroma agradável no início da fermentação, começando logo nos primeiros dias a destacar-se o aroma floral e a maracujá. Contudo, a partir do 4.º dia de fermentação começou a apresentar um leve aroma a ovos podres que se foi destacando, cada vez mais ao longo do tempo. Todavia, este aroma sulfurado podia ser removido com agitação intensa do copo, passando a destacar-se o aroma a fruta tropical;
- **Estirpe Y6:** Desde o início até ao fim da fermentação apresentou um aroma frutado, lembrando fruta tropical. A partir do 6.º dia da fermentação alcoólica começou a distinguir-se o aroma a maracujá e no último dia da fermentação foi possível identificar um aroma que lembrava lichias e um leve aroma floral;
- **Estirpe Y8:** Esta estirpe começou por apresentar um aroma desagradável, lembrando ovos podres, levando a suspeitar que existia uma carência de nutrientes por parte da estirpe. Contudo a partir do 6.º dia da fermentação alcoólica, o aroma desagradável, até então intenso, começou a diminuir dando lugar a diversos aromas ao longo dos restantes dias até ao término da fermentação alcoólica. Inicialmente, no início do 6.º dia destacava-se um aroma frutado, lembrando a pera, passando no 7º dia para uma mistura de aroma tropical, floral e fumeiro. Nos restantes dias o aroma tropical destacava-se com um leve aroma a manteiga;

- **Estirpe Lalvin QA23®:** Desde o início até ao fim da fermentação apresentou um aroma frutado, lembrando fruta citrina;
- **Estirpe Y10:** Desde o início até ao fim da fermentação o mosto apresentou um aroma frutado. Nos primeiros dias não era possível identificar um aroma específico de nenhuma fruta, contudo a partir do 6.º dia de FA começou a distinguir-se o aroma a pera e maçã;
- **Estirpe Y12:** O mosto apresentava um aroma agradável no início da fermentação, começando logo nos primeiros dias a destacar-se o aroma frutado que lembrava fruta tropical. Contudo, a partir do 4.º dia de fermentação começou a apresentar um leve cheiro a ovos podres. Este aroma sulfurado diminuiu de intensidade dando lugar a um aroma frutado e outro mais doce, a mel. A partir do 6.º dia e até ao final da fermentação alcoólica os aromas apresentados intercalavam-se entre um aroma vegetal, que lembrava relva, e um aroma frutado, fruta tropical. No último dia da fermentação alcoólica apresentava um aroma frutado e um aroma floral;
- **Estirpe Y14:** Desde o início até ao fim da fermentação apresentou um aroma frutado, lembrando fruta tropical;
- **Estirpe Y15:** O mosto apresentava um aroma agradável no início da fermentação, começando logo nos primeiros dias a destacar-se o aroma frutado que lembrava fruta tropical. Contudo, a partir do 4.º dia de fermentação começou a apresentar um leve cheiro a ovos podres que se foi destacando cada vez mais ao longo dos dias. Todavia, este aroma sulfurado podia ser removido com agitação intensa do copo, passando a destacar-se o aroma a fruta tropical que se manteve até ao final da fermentação;
- **Estirpe Y17:** O mosto apresentava um aroma agradável no início da fermentação, começando logo nos primeiros dias a destacar-se o aroma frutado que lembrava ananás. Contudo, a partir do 5.º dia de fermentação começou a apresentar um leve aroma vegetal que lembrava feno que se foi destacando cada vez mais ao longo dos dias. Todavia, era sempre perceptível um aroma frutado a fruta tropical, que embora leve na maior parte do tempo, se destacou nos dias 10 e 12 da fermentação alcoólica, assim como no último dia;
- **Estirpe Y18:** Desde o início até ao fim da fermentação apresentou um aroma frutado, lembrando fruta citrina. A partir do 7.º dia de FA foi possível distinguir um outro aroma que lembrava flor de laranjeira.

No que diz respeito à formação de espuma, foram encontrados dois extremos, ou seja, estirpes que não produziram muita espuma ou mesmo quase nenhuma espuma, ao longo de toda a fermentação alcoólica, e outras que produziram muita espuma. Existiram também casos que se encontraram entre estes dois extremos. Assim, relativamente a este último grupo citado, é possível dividi-lo em dois subgrupos:

- i. As estirpes que apresentaram uma formação moderada/elevada no meio da fermentação alcoólica. Apesar disso, no início e no fim da fermentação apresentaram uma formação quase nula de espuma. Neste subgrupo encontram-se as estirpes Y3, Y5, Y6, Y15 e Y18 (Figura 23);



Figura 23 – Produção de espuma ao longo da fermentação, relativamente às estirpes Y3, Y5, Y6, Y15 e Y18, onde a imagem 1 representa os primeiros 3 dias, a imagem 2 os dias 4 a 8, e a imagem 3 até ao final da fermentação, destas 5 estirpes.

- ii. O outro subgrupo compreende as estirpes que, apesar de não formarem muita espuma, a sua presença é contínua desde o início até ao fim da fermentação, nomeadamente as estirpes Y4, Y8 e Y10. Ao contrário do grupo anterior, estas estirpes começaram a produzir espuma logo no início da fermentação, atingindo o seu pico de produção entre os 4.º e 6.º dias, diminuindo depois à medida que a fermentação chegou ao fim (Figura 24). Contudo a espuma nunca chegou a desaparecer ao contrário do primeiro caso;



Figura 24 – Produção de espuma ao longo da fermentação, relativamente às estirpes Y4, Y8 e Y10, onde a imagem 1 representa os primeiros 3 dias, a imagem 2 os dias 4 a 6, e a imagem 3 até ao final da fermentação, destas 3 estirpes.

- iii. Por último, destacaram-se as estirpes cuja produção se manteve praticamente nula ao longo de toda a fermentação, e as estirpes que produziam muita espuma. As estirpes Y14 e a comercial Lalvin QA23® destacam-se pela sua produção quase nula de espuma, mas, em contrapartida as estirpes Y12 e Y17 foram as que apresentaram uma maior produção de espuma (Figura 25).



Figura 25 – Produção de espuma ao longo da fermentação, relativamente às estirpes Y14 e a Lalvin QA23® (1) e Y12 e Y17 (2).

É interessante, e de realçar as estirpes Y5, Y6, Y10 e Y12, pela sua capacidade de sedimentação. Perto do final das fermentações, o mosto em fermentação apresentava um tom caramelo escuro límpido, comparativamente com a cor apresentada nos dias anteriores (Figura 26).



Figura 26 – Diferença da cor do mosto em fermentação no 8.º dia (1) e no 9.º dia (2) de fermentação – Estirpe Y6.

A Figura 26 mostra o aspeto físico do mosto em fermentação da estirpe Y6 no 8.º dia e no 9.º dia de fermentação, um pouco antes de a fermentação ser dada como terminada. É notória a diferença, relativamente à cor do mosto, entre as duas imagens. O mesmo aconteceu com a estirpe Y5. A única diferença entre as duas foi que o tempo de fermentação da estirpe Y5 foi mais longo, e começou a apresentar esta característica três dias antes de ter sido dada como terminada, que ocorreu ao fim de aproximadamente 13 d, sendo que foi possível observar a diferença da tonalidade da cor no dia 10.

4.3 Caracterização físico-química dos vinhos

Durante a fermentação do mosto, a levedura está sujeita a stress, devido à elevada concentração inicial de açúcar, stress ácido, depleção de nutrientes (azoto, lípidos, vitaminas) e toxicidade do etanol. Uma fermentação alcoólica típica compreende uma fase de latência, que dura várias horas; uma fase de crescimento, que dura 24 h a 36 h; seguida de uma fase estacionária, durante a qual a maior parte do açúcar é consumida. As características mais desejáveis das leveduras, em relação ao vinho, incluem a rápida e completa degradação dos açúcares em etanol e CO₂, assim como a síntese de outros metabolitos, como compostos voláteis do aroma que influenciam positivamente o seu perfil sensorial, sem produzir compostos indesejáveis. Existem numerosos subprodutos de origem fermentativa como o glicerol, os ácidos carboxílicos, os aldeídos, os álcoois superiores, os ésteres, os compostos de enxofre, etc, que derivam da degradação de açúcares, aminoácidos e ácidos gordos. No entanto, as leveduras podem também hidrolisar precursores da uva para libertar aromas varietais (monoterpenos e tióis) [71].

Assim, este ponto remete aos resultados e discussão da avaliação de alguns parâmetros físico-químicos dos vinhos produzidos. De forma a facilitar o entendimento, este ponto está dividido em tópicos, relativamente a cada parâmetro analisado, nomeadamente: açúcares fermentescíveis (analisados por HPLC); *TAI* (FTIR), etanol e glicerol (HPLC); acidez total, acidez volátil e pH (FTIR); ácidos orgânicos (HPLC); compostos voláteis minoritários do aroma (GC-MS); composto voláteis maioritários do aroma (GC-FID). Para a quantificação dos componentes por HPLC foi necessário elaborar curvas de calibração, apresentadas na Tabela B.1 (Anexo B).

4.3.1 Açúcares fermentescíveis – glucose e frutose

Na Tabela 8 encontram-se as concentrações de glucose e frutose de cada vinho, para ser possível a sua classificação quanto ao teor de açúcar. É interessante relembrar que o mosto apresentava uma concentração de glucose e frutose de 88,9 g/L e de 121,3 g/L, respetivamente. Segundo o Regulamento (CE) N.º 607/2009 [37], classifica-se quase todos os vinhos como vinhos secos, dado possuírem uma concentração de açúcares inferior a 4 g/L, com exceção dos vinhos Y5, Y10, Y12, Y14 e Y17 que são classificados como vinhos adomados pois a sua concentração de açúcares está compreendida entre 4 g/L e 12 g/L.

Tabela 8 – Concentrações de glucose (C_{glucose}), de frutose (C_{frutose}) e de hexoses (C_{hexoses}), determinados por HPLC, e respetivo erro associado ($p = 0,05$)

	C_{glucose} g/L	C_{frutose} g/L	C_{hexoses} g/L
Y3	1,64 ± 1,18	1,67 ± 1,43	3,32 ± 1,85
Y4	1,29 ± 1,19	2,21 ± 1,41	3,50 ± 1,85
Y5	1,40 ± 1,18	3,54 ± 1,39	4,55 ± 1,82
Y6	1,70 ± 1,17	2,04 ± 1,42	3,74 ± 1,20
Y8	1,49 ± 1,18	2,09 ± 1,42	3,59 ± 1,20
Lalvin QA23®	1,84 ± 1,17	1,43 ± 1,44	3,26 ± 1,86
Y10	1,74 ± 1,18	3,02 ± 1,39	4,76 ± 1,82
Y12	1,24 ± 1,18	6,94 ± 1,29	8,18 ± 1,75
Y14	3,58 ± 1,13	2,21 ± 1,41	5,79 ± 1,81
Y15	1,33 ± 1,19	2,12 ± 1,42	3,45 ± 1,85
Y17	1,34 ± 1,18	2,92 ± 1,39	4,26 ± 1,83
Y18	1,68 ± 1,18	1,79 ± 1,43	3,46 ± 1,85

No caso dos vinhos secos, a concentração de açúcar residual é, geralmente, insuficiente para constituir uma ameaça microbiana do vinho engarrafado. Contudo, em concentrações mais elevadas, os açúcares residuais representam um risco microbiano. Isto é particularmente marcado nos vinhos doces, com baixos níveis de álcool e ácido [7].

As leveduras metabolizam preferencialmente a glucose e, por este motivo a frutose é o principal açúcar presente durante as fases finais da fermentação do vinho [71]. Tal é possível observar na Tabela 8, onde se vê que as concentrações de frutose são superiores às concentrações de glucose em quase todos os vinhos, com exceção da estirpe Y14 e da comercial Lalvin QA23®. Contudo, devido aos erros associados serem grandes, é difícil obter uma conclusão.

4.3.2 Etanol, TAV e Glicerol

Do metabolismo da glucose e da frutose são formados o etanol e o glicerol [35]. O etanol é sem dúvida o álcool mais importante no vinho e o principal produto da fermentação alcoólica pela levedura. Para além das suas importantes funções organoléticas, também tem um papel

importante no controlo microbiano, dado que o aumento da sua concentração durante a fermentação inibe o crescimento microbiano, agindo então como um conservante do vinho [7].

O poliol do vinho mais proeminente é o glicerol, que se forma durante a etapa de fermentação, variando entre 6 g/L e 15 g/L. Por conferir macieza ao vinho é também considerado um fator de qualidade, além de ser possuidor de um sabor ligeiramente doce. Dado afetar o perfil organolético do vinho, torna-se importante, novamente, controlar bem a fermentação, sendo que em relação a este componente é essencial controlar a temperatura, o nível de pH, o arejamento e a concentração de dióxido de enxofre [7].

Na Tabela 9 encontram-se os valores de *TAV* determinado por FTIR, as concentrações de glicerol e de etanol quantificados por HPLC, de cada vinho produzido durante o estudo.

Tabela 9 – Valores do título alcoométrico volúmico (*TAV*), determinado por FTIR, e as concentrações de etanol (C_{etanol}) e de glicerol (C_{glicerol}), quantificadas por HPLC, associadas ao respetivo erro ($p = 0,05$)

	$\frac{C_{\text{etanol}}}{\text{g/L}}$	$\frac{TAV}{\%}$	$\frac{C_{\text{glicerol}}}{\text{g/L}}$
Y3	103,6 ± 11,1	12,0 ± 0,4	5,95 ± 0,22
Y4	123,1 ± 17,0	13,1 ± 0,3	8,96 ± 0,25
Y5	104,5 ± 11,4	12,5 ± 0,3	6,37 ± 0,22
Y6	119,8 ± 16,0	12,6 ± 0,4	9,33 ± 0,26
Y8	116,4 ± 15,0	13,2 ± 0,4	7,58 ± 0,23
Lalvin QA23®	123,1 ± 17,0	13,3 ± 0,4	8,70 ± 0,25
Y10	120,7 ± 16,3	12,6 ± 0,2	9,77 ± 0,26
Y12	117,5 ± 15,3	12,0 ± 0,7	9,20 ± 0,25
Y14	123,8 ± 17,3	12,6 ± 0,3	8,09 ± 0,24
Y15	111,6 ± 13,5	11,7 ± 0,4	7,33 ± 0,23
Y17	121,1 ± 16,4	12,6 ± 0,4	9,40 ± 0,26
Y18	118,2 ± 15,5	12,3 ± 0,4	8,36 ± 0,24

A concentração de etanol variou entre 103,6 g/L e 123,8 g/L, representando o mínimo e o máximo obtido pela estirpe Y3 e Y14, respetivamente. Segundo o Regulamento (CE) N.º 479/2008 [3], o vinho deve ter um *TAV* igual ou superior a 9 % e inferior a 15 %. Concluindo

que todos os vinhos estão dentro dos limites legais, sendo o maior valor representado pela estirpe comercial Lalvin QA23®, que apresentou um *TAV* de 13,3 %. Além disso, os valores de *TAV* apresentados na Tabela 9 estão relativamente próximos dos valores de AP_{aer} indicados na Tabela 5. Uma vez que, o valor de *TAV*, por definição, contempla o etanol e outros voláteis presentes no destilado, a estirpe que obteve o maior valor de *TAV*, pode não ser necessariamente a que tem uma maior concentração de etanol.

Relativamente ao glicerol, segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) [31], a sua concentração mínima no vinho deve ser de 5 g/L, mas pode atingir valores até 15 g/L a 20 g/L, dependendo das condições de fermentação. De acordo com os autores, o glicerol é o subproduto mais importante da fermentação alcoólica. Na Tabela 10, os valores de concentrações de glicerol encontrados foram de encontro ao exposto na bibliografia. A estirpe Y10 foi a que apresentou um maior teor de glicerol, atingindo um máximo de 9,77 g/L. Estes valores poderão ter contribuído positivamente para o produto final. Todos os vinhos apresentaram concentrações superiores a 5 g/L, cumprindo assim o limite descrito anteriormente.

4.3.3 Acidez Total, Acidez Volátil e pH

A acidez total é, normalmente, expressa em ácido tartárico, e segundo o Regulamento (CE) N.º 491/2009 [76] o limite mínimo no vinho é de 3,5 g/L. Segundo Ribéreau-Gayon (2006) [31] e Jackson (2008) [4], para a maioria dos vinhos de mesa, é desejável uma gama de acidez total entre 5,5 mg/L e 8,5 mg/L (expressa em ácido tartárico). Os vinhos brancos são tipicamente preferidos no extremo superior da escala.

O pH no vinho é baseado no equilíbrio de dissociação dos vários ácidos, a temperatura e pressão fixas. Os valores de pH dos vinhos variam, geralmente, entre 2,8 e 3,8 [31]. Contudo, uma gama de pH entre 3,1 e 3,4 é adequada para a maioria dos vinhos brancos [4]. Estes valores tão baixos de pH são bons para o vinho, pois isso aumenta a sua estabilidade microbiológica e físico-química. O baixo pH dificulta o desenvolvimento de microrganismos, ao mesmo tempo que aumenta a fração antisséptica do dióxido de enxofre. Vinhos com pH superior a 3,5 não têm acidez suficiente para o proteger contra o crescimento de microrganismos, como as bactérias acéticas [77]. Os vinhos possuem uma mistura de ácidos, combinados para formarem sais em maior ou menor grau, de acordo com o seu pKa. A comparação do pKa dos ácidos leva à

conclusão de que o ácido tartárico é o mais forte, pelo que terá prioridade na formação de sais. A proporção de sais também depende da origem geográfica, variedade de uva e métodos de vinificação utilizados. Assim, o ácido tartárico é um ácido que afeta diretamente o valor do pH [31].

A acidez volátil é definida como o conjunto de ácidos gordos da série acética presente nos vinhos, tanto na forma livre como na sua forma combinada, sendo, geralmente, expressa em ácido acético. Segundo o Regulamento (CE) N.º 606/2009 [42] o teor de acidez volátil não pode exceder os 1,08 g/L, expressa em ácido acético, no caso dos vinhos brancos e dos vinhos rosados.

Na Tabela 10 encontram-se os valores de *AT*, *AV* e pH de cada vinho produzido durante o estudo. Verifica-se que os valores da acidez total variam entre 3,0 g/L e 3,5 g/L, não se encontrando dentro do intervalo descrito por Ribéreau-Gayon (2006) [31] e Jackson (2008) [4] nem respeitam o limite mínimo legislado. Somente o vinho produzido pela estirpe Y3 atingiu o valor máximo de 3,5 g/L de acidez total, sendo este o limite mínimo imposto. Tal já era esperado, dado que a concentração de ácido tartárico no mosto se encontrava entre 3,8 g/L e 4,7 g/L, e sabe-se que durante a fermentação alcoólica, a concentração do ácido tartárico diminui em consequência da diminuição da sua solubilidade [31]. O ácido precipita como tartarato de cálcio ou bitartarato de potássio, provocando uma diminuição da acidez total [34].

Os valores do pH apresentados na Tabela 10 variam entre 3,43 e 3,54, concluindo-se que todos os vinhos se encontram dentro do intervalo de pH normal, mas nenhum possui um valor de pH ideal para vinho branco definido por Jackson (2008) [4]. Este diz que uma gama de pH entre 3,1 e 3,4 é adequada para a maioria dos vinhos brancos. O pH do vinho depende da concentração dos ácidos orgânicos e da concentração de catiões, especialmente o catião potássio [34].

A acidez volátil é considerada um parâmetro físico-químico de grande importância, a ser monitorizado ao longo do processo de vinificação, representando as formas livres e combinadas de ácidos voláteis. O ácido acético é o maior representante deste grupo, contribuindo com cerca de 90 % da concentração total dos ácidos voláteis e contribui com aromas e sabores agradáveis, quando em concentrações reduzidas, na ordem dos 0,2 g/L a 0,3 g/L [8,31]. Dentro do intervalo mencionado, somente os vinhos Y3, Y10 e Y14 apresentam valor inferior a 0,3 g/L. O ácido acético tem um limiar de percepção olfativa (*LPO*) de 0,2 g/L [78] e segundo Escudero *et al.* (2004) [79] este ácido apresenta um aroma a vinagre, sendo assim não é

desejável um valor muito superior ao *LPO*. Conclui-se que o vinho Y18, possui um valor de acidez volátil mais elevado, e foi de facto o que apresentou um aroma a vinagre durante o exame sensorial.

Tabela 10 – Concentrações de acidez total (*AT*), acidez volátil (*AV*) e os valores de pH, determinados por FTIR, associados ao respetivo erro ($p = 0,05$)

	$\frac{AT}{g/L}$	$\frac{AV}{g/L}$	pH
Y3	3,5 ± 0,1	0,29 ± 0,02	3,43 ± 0,02
Y4	3,3 ± 0,1	0,31 ± 0,02	3,45 ± 0,04
Y5	3,0 ± 0,2	0,37 ± 0,04	3,44 ± 0,01
Y6	3,1 ± 0,1	0,31 ± 0,03	3,50 ± 0,04
Y8	3,4 ± 0,1	0,32 ± 0,07	3,54 ± 0,03
Lalvin QA23®	3,0 ± 0,2	0,31 ± 0,02	3,54 ± 0,03
Y10	3,4 ± 0,1	0,28 ± 0,01	3,47 ± 0,09
Y12	3,4 ± 0,2	0,30 ± 0,10	3,53 ± 0,04
Y14	3,2 ± 0,2	0,26 ± 0,01	3,49 ± 0,02
Y15	3,3 ± 0,1	0,43 ± 0,07	3,52 ± 0,03
Y17	3,4 ± 0,3	0,43 ± 0,14	3,52 ± 0,04
Y18	3,3 ± 0,1	0,51 ± 0,05	3,52 ± 0,01

Contudo, todos os vinhos produzidos respeitam o limite imposto pela lei, apresentando valores de acidez volátil inferiores a 1,08 g/L. Valores muito altos de ácido acético estão associados a contaminações do mosto ou do vinho por bactérias acéticas [4], mas dado terem sido encontrados valores “normais”, que não houve contaminação por parte destas bactérias. O ácido acético também pode ser produzido antes da fermentação alcoólica por deterioração microbiana das uvas infetadas com *Botrytis cinerea*, mas não parece ter sido o caso.

4.3.4 Ácidos orgânicos

Os principais ácidos orgânicos presentes no vinho, com maior impacto na sua acidez, podem ter origem na uva, nomeadamente, o ácido tartárico, o ácido málico e o ácido cítrico, ou

são ácidos provenientes da etapa de fermentação, como o ácido succínico. A concentração destes ácidos foi quantificada por HPLC e os resultados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 – Concentração do ácido tartárico ($C_{Ac. Tartárico}$), do ácido málico ($C_{Ac. Málico}$), do ácido cítrico ($C_{Ac. Cítrico}$) e do ácido succínico ($C_{Ac. Succínico}$), determinado por HPLC, associados ao respetivo erro ($p = 0,05$)

	$\frac{C_{Ac. Tartárico}}{g/L}$	$\frac{C_{Ac. Málico}}{g/L}$	$\frac{C_{Ac. Cítrico}}{g/L}$	$\frac{C_{Ac. Succínico}}{g/L}$
Y3	0,88 ± 0,19	2,76 ± 0,05	0,95 ± 0,04	1,82 ± 0,07
Y4	0,99 ± 0,19	2,56 ± 0,05	0,99 ± 0,04	2,05 ± 0,08
Y5	1,13 ± 0,18	1,72 ± 0,05	0,73 ± 0,04	2,40 ± 0,10
Y6	1,19 ± 0,19	2,04 ± 0,05	1,12 ± 0,05	3,52 ± 0,15
Y8	0,94 ± 0,19	1,65 ± 0,05	0,94 ± 0,04	3,84 ± 0,16
Lalvin QA23®	1,07 ± 0,19	2,25 ± 0,05	0,97 ± 0,04	3,20 ± 0,13
Y10	1,09 ± 0,19	2,72 ± 0,05	1,28 ± 0,05	2,90 ± 0,12
Y12	1,21 ± 0,19	2,59 ± 0,05	0,69 ± 0,04	3,75 ± 0,16
Y14	1,13 ± 0,19	2,26 ± 0,05	0,94 ± 0,04	2,94 ± 0,12
Y15	1,03 ± 0,19	1,61 ± 0,05	0,62 ± 0,04	3,24 ± 0,14
Y17	1,19 ± 0,19	1,87 ± 0,05	0,87 ± 0,04	3,25 ± 0,14
Y18	1,15 ± 0,19	2,01 ± 0,05	0,66 ± 0,04	2,01 ± 0,08

Os valores da concentração de ácido tartárico encontram-se, geralmente, entre 4,5 g/L a 15 g/L, contudo o seu valor depende fortemente da região, do clima e da maturação da uva [15]. Segundo a Tabela 11, os valores desse ácido encontram-se compreendidos entre 0,88 g/L e 1,21 g/L. Estes valores são bastante inferiores ao intervalo mencionado. Tal já era esperado, dado que a concentração de ácido tartárico no mosto se encontrava entre 3,8 g/L e 4,7 g/L, e sabe-se que durante a fermentação alcoólica, a concentração do ácido tartárico diminui em consequência da diminuição da sua solubilidade [31]. Além disso, esta discrepância também pode estar associada ao facto de as amostras de vinho terem sido congeladas. Por este motivo, pode ter havido perda de ácido tartárico devido à sua precipitação em sais de tartarato.

Junto com o ácido tartárico, o ácido málico é um dos principais ácidos orgânicos. O seu valor diminui à medida que as uvas amadurecem, especialmente em condições de temperaturas

elevadas [4]. Assim, a concentração deste ácido está diretamente relacionada com o clima do local onde as vinhas estão localizadas, existindo uma maior tendência para reter o ácido em regiões mais frias. Os mostos das regiões do Norte podem conter concentrações de ácido málico entre 4 g/L e 6,5 g/L, enquanto que nas regiões do Sul, as concentrações são apenas de 1 g/L a 2 g/L [31]. Os valores encontrados no mosto variaram entre 2,1 g/L e 2,3 g/L. A sua concentração não sofreu grandes variações dado que não ocorreu fermentação malolática.

O ácido cítrico, juntamente com os anteriores, representa um dos principais ácidos orgânicos com origem na uva, sendo dos três o menor representante. Assim como o ácido málico, este ácido encontra-se largamente difundido na natureza, mas em maior quantidade nas nos citrinos e em menor na uva [80]. Segundo o Regulamento (CE) N.º 606/2009, o limite máximo de ácido cítrico no vinho é de 1 g/L. Este ácido estava presente no mosto com uma concentração aproximada de 0,6 g/L. Este composto geralmente sofre um ligeiro aumento na sua concentração durante a fermentação alcoólica, tal como se evidencia na Tabela 11. Contudo, se tivesse ocorrido fermentação malolática este ácido poderia ter sido degradado pelo que a sua concentração iria diminuir, podendo atingir valores de 0,15 g/L [15]. Nem todos os vinhos tiveram concentrações inferiores a 1 g/L. Os vinhos Y6 e Y10 apresentaram concentrações deste ácido acima do valor referido, não cumprindo assim o limite imposto por lei.

O ácido succínico é um dos mais comuns subprodutos da fermentação, e não do metabolismo da uva [4]. Este ácido possui um gosto intensamente amargo e salgado o que provoca salivação e acentua o sabor do vinho [31]. Não existem regulamentos relacionados a este composto que indiquem um limite legal de concentração, mas dada as suas características organoléticas a sua concentração não deve ser muito elevada. Na Tabela 11, verifica-se que a sua concentração está compreendida entre 1,82 g/L e 3,84 g/L, sendo estes limites mínimo e máximo representados pelas estirpes Y3 e Y8, respetivamente.

4.3.5 Compostos voláteis maioritários do aroma

A maioria dos álcoois superiores são metabolitos secundários produzidos pela levedura e podem ter impactos positivos e negativos no aroma e sabor do vinho. Quando a sua concentração total no vinho é inferior a 300 mg/L contribuem de forma positiva para o aroma. Acima de 400 mg/L são geralmente um fator negativo [41] podendo resultar num cheiro forte e pungente,

enquanto os níveis ótimos proporcionam caracteres frutados [38]. O 2-feniletanol, é a exceção, geralmente contribuindo de modo positivo para o aroma do vinho, caracterizando-se por um cheiro agradável a rosa e ser adocicado [33]. Os álcoois superiores quantificados por GC-FID nos vinhos produzidos foram o 1-propanol, o 2-metil-1-propanol (isobutanol), o 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), o 2-metil-1-butanol, o 2-feniletanol. Pelo mesmo método foi possível também quantificar o acetaldeído, o acetato de etilo e o metanol. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

De uma forma geral, rapidamente se conclui que as concentrações totais dos álcoois superiores são bastante elevadas. Segundo a Tabela 12, a concentração total dos álcoois superiores dos vinhos, variou entre 270,1 mg/L e 455,4 mg/L. Este intervalo apresentado mostra que quase todos os vinhos apresentam um valor de álcoois superiores total acima de 300 mg/L. Somente o vinho Y18 obteve valores inferiores a essa concentração, contudo está associado a um desvio padrão muito grande. Destacam-se, pela negativa, os vinhos Y3 e Y17, que apresentaram valores superiores 400 mg/L.

Em todas as amostras, 1-propanol apresentou-se abaixo do limiar de percepção, que é de 830 mg/L [81], encontrando-se entre 31,9 mg/L e 80,9 mg/L (Tabela 12). Este composto apresenta um aroma a álcool [35]. O 2-metil-1-propanol, em todos os vinhos, apresentou concentrações acima do seu limiar de percepção olfativa (*LPO*), que é em torno de 40 mg/L [81] (Tabela 12). Este componente está associado a descritores considerados negativos, dado que o composto em causa, apresenta aroma a álcool, spiritoso, amargo, maltado [35, 82–84].

As concentrações encontradas para o 2-metil-1-butanol variaram de 21,8 mg/L a 41,4 mg/L (Tabela 12). Este composto apresenta um aroma a álcool, banana, solvente e medicinal [35] e Siebert *et al.* (2005) [82] descrevem o composto como tendo um aroma a verniz de unhas.

Os valores de concentração do 3-metil-1-butanol analisado em todos os vinhos produzidos encontram-se compreendidos entre 125,0 mg/L e 211,3 mg/L (Tabela 12), sendo esse intervalo bastante superior ao limiar de percepção que é de 7 mg/L a 30 mg/L [85]. Este composto apresenta um aroma a banana, álcool, adocicado e aromático [35]. Contudo, segundo Escudero *et al.* (2004) [79], este composto foi descrito como tendo aroma a queijo e Siebert *et al.* (2005) [82] como áspero e a verniz de unhas.

Tabela 12 – Concentrações médias (*C*) dos compostos voláteis maioritários detetados nos vinhos por análise quantitativa por GC-FID, associados aos limiares de percepção olfativa (*LPO*), com o respetivo desvio-padrão, relativamente a cada estirpe avaliada

	<i>LPO</i> mg/L				Álcoois Superiores					TOTAL
		Acetaldeído	Acetato de Etilo	Metanol	1-propanol	2-metil-1-propanol	2-metil-1-butanol	3-metil-1-butanol	2-feniletanol	
		10 ^a	12,3 ^b	668 ^a	830 ^a	40 ^a	-	7 a 30 ^c	14 ^d	
<i>C</i> mg/L	Y3	2,5 ± 1,1	47,5 ± 16,0	3,7 ± 0,8	66,9 ± 9,8	104,7 ± 21,1	33,8 ± 3,4	211,3 ± 32,2	38,7 ± 25,2	455,4 ± 47,2
	Y4	5,4 ± 2,1	39,3 ± 10,3	6,4 ± 1,1	60,1 ± 20,2	89,8 ± 31,0	26,2 ± 4,7	168,5 ± 35,8	23,3 ± 1,3	367,9 ± 51,8
	Y5	16,4 ± 9,3	27,6 ± 7,5	5,4 ± 0,03	31,9 ± 3,7	61,1 ± 11,6	32,8 ± 3,8	155,2 ± 16,7	28,8 ± 2,0	309,8 ± 21,1
	Y6	10,6 ± 0,8	31,3 ± 1,1	1,3 ± 0,2	45,9 ± 5,6	89,4 ± 10,1	32,3 ± 4,2	183,2 ± 20,1	15,6 ± 0,6	366,4 ± 23,6
	Y8	13,0 ± 8,6	47,4 ± 6,6	2,8 ± 0,7	48,0 ± 5,9	107,8 ± 7,4	33,1 ± 1,9	184,0 ± 17,3	20,5 ± 8,6	393,4 ± 21,6
	QA23	18,0 ± 5,6	43,1 ± 3,2	4,7 ± 0,7	75,8 ± 6,3	78,7 ± 2,4	21,8 ± 1,2	168,4 ± 7,6	22,8 ± 0,4	367,5 ± 10,2
	Y10	7,0 ± 0,6	38,2 ± 6,6	2,8 ± 0,9	50,8 ± 8,4	91,3 ± 2,3	22,6 ± 0,6	144,8 ± 1,0	33,6 ± 23,4	343,1 ± 25,0
	Y12	22,3 ± 8,4	32,8 ± 6,1	2,6 ± 0,7	47,1 ± 2,0	81,3 ± 2,3	24,8 ± 1,1	137,4 ± 1,9	19,8 ± 1,9	310,4 ± 4,2
	Y14	14,1 ± 1,3	36,4 ± 3,5	1,3 ± 0,2	80,9 ± 9,8	69,4 ± 8,8	23,6 ± 1,6	158,4 ± 6,0	17,3 ± 0,8	349,5 ± 14,6
	Y15	30,0 ± 3,6	28,1 ± 0,2	1,9 ± 0,1	34,3 ± 0,4	97,8 ± 5,4	24,9 ± 0,2	130,2 ± 1,7	22,3 ± 0,2	309,5 ± 5,7
	Y17	28,0 ± 0,8	40,9 ± 6,9	6,3 ± 0,7	32,7 ± 0,7	107,6 ± 0,02	41,4 ± 3,2	201,9 ± 16,0	52,9 ± 10,4	436,5 ± 19,4
Y18	13,1 ± 4,5	29,9 ± 2,7	4,8 ± 1,8	33,6 ± 14,2	65,5 ± 30,5	26,8 ± 15,2	125,0 ± 70,4	19,2 ± 1,1	270,1 ± 79,5	

a – Moreno *et al.* (2005) [81]; b – Escudero *et al.* (2004) [79]; c – Viana *et al.* (2011) [85]; d – Ferreira *et al.* (2000) [86].

Em relação às concentrações de 2-feniletanol, segundo a Tabela 12, também esteve acima do limiar de percepção, que é de 14 mg/L [86]. Neste caso, os valores encontrados são uma vantagem para os vinhos produzidos, dado que, diversos autores descrevem este composto como possuindo aroma a rosas [79,82,83], adocicado [84,87] e perfumado [35]. Os vinhos analisados apresentaram valores de 2-feniletanol compreendidos entre 15,6 mg/L e 52,9 mg/L.

O acetaldeído (ou etanal) é o principal aldeído do vinho, representando muitas vezes mais de 90 % do teor de aldeídos e um dos primeiros subprodutos metabólicos da fermentação [4]. Acima dos valores do limiar de percepção, é considerado geralmente um fator negativo. Como o acetaldeído é reduzido para etanol, a sua concentração diminuiu ao longo da fermentação, atingindo concentrações inferiores a 200 mg/L [35]. De acordo com a Tabela 12, quase todos os vinhos produzidos apresentaram valores de acetaldeído superiores ao limiar de percepção, que é de 10 mg/L [81], dado que os valores encontrados estavam compreendidos entre 2,5 mg/L e 30,0 mg/L. De acordo com Czerny *et al.* (2008) [84] este composto apresenta um aroma fresco a folhas verdes. Mas a presença de acetaldeído nos vinhos brancos é uma indicação de oxidação [38]. Somente os vinhos Y3, Y4 e Y10 apresentaram uma concentração inferior ao limiar de percepção. O vinho produzido pela estirpe Y15, durante o exame sensorial, foi o que se detetou um maior nível de oxidação, sendo de facto o vinho onde se quantificou uma maior concentração de acetaldeído.

Em todas as amostras dos vinhos produzidos, os valores de acetato de etilo apresentaram valores acima do limiar de percepção, que é de 12,3 mg/L [79]. Segundo a Tabela 12, as concentrações do composto estavam compreendidas entre 27,6 mg/L e 47,5 mg/L. O acetato de etilo apresenta um aroma de solvente e frutado [88]. Em concentrações elevadas (> 100 mg/L) este composto é considerado um defeito a nível sensorial [25], mas nenhum vinho apresentou valores acima dessa concentração, e durante o exame sensorial nenhum dos vinhos apresentou o aroma a “cola solvente”.

Por último, as concentrações de metanol encontram-se compreendidas entre 1,3 mg/L e 6,4 mg/L (Tabela 12), pelo que se conclui que estão bem aquém do limiar de percepção, que é de 668 mg/L [81]. Do mesmo modo, os valores apresentados encontram-se abaixo dos valores aconselhados pela OIV [88], que impõe um valor máximo de 250 mg/L no caso dos vinhos brancos, dado que é um composto que está associado a efeitos adversos na saúde do ser humano.

4.3.6 Compostos voláteis minoritários do aroma

Nos vinhos foram identificados e quantificados 18 compostos voláteis minoritários por GC-MS, que se consideraram de maior interesse, englobando 1 álcool monoterpénico, 4 ésteres etílicos de ácidos gordos, 2 acetatos de álcoois superiores, 8 ácidos gordos voláteis, 1 álcool e 2 fenóis voláteis, descritos na Tabela 13. Para um melhor entendimento dos descritores olfativos associados a cada composto volátil minoritário quantificado, elaborou-se a Tabela 14. Nesta, é narrado o respetivo descritor na visão de diferentes autores. Deste modo torna-se mais evidente a sua contribuição para o perfil sensorial do vinho.

O álcool monoterpénico citronelol possuiu um aroma floral, mais especificamente a planta Citronela [31,89]. Álcoois monoterpénicos como por exemplo o geraniol, linalol, nerol e citronelol são conhecidos como compostos importantes nas uvas [87]. As concentrações de citronelol, descritas na Tabela 13, foram bastante próximas, obtendo-se uma concentração máxima de 10 µg/L, não ultrapassando o seu *LPO*, que é de 18 µg/L [31]. Contudo, o composto não foi encontrado em todos os vinhos produzidos, sendo esperado a sua presença em todos e com concentrações idênticas, dado que foi usado o mesmo mosto em todos os ensaios. Algumas espécies de levedura, incluindo a *Saccharomyces cerevisiae*, são capazes de reduzir o geraniol em citronelol, durante a fermentação [4]. Deduz-se assim que algumas das estirpes estudadas são capazes de fazer essa conversão. Além disso, as leveduras podem hidrolisar precursores do citronelol, se existirem no mosto (não quantificados neste trabalho), libertando assim a aglicona aromática.

Em relação aos acetatos de álcoois superiores, nomeadamente o acetato de isoamilol (acetato 3-metilbutilo) e o acetato de 2-feniletilo, os valores encontrados estão compreendidos entre 990,4 µg/L e 2706,5 µg/L e entre 81,0 µg/L e 305,1 µg/L, respetivamente. O *LPO* do acetato de isoamilol é de 30 µg/L. Assim analisando a Tabela 13, observa-se que nenhum vinho produzido possui este composto abaixo do seu *LPO*. O *LPO* do acetato de 2-feniletilo é de 250 µg/L e somente o vinho produzido pela estirpe Y6 ultrapassa este valor. Segundo Escudero *et al.* (2004) [79] o acetato de isoamilol é descrito com aroma a banana enquanto que o acetato de 2-feniletilo com aroma floral. Segundo Swiergers *et al.* (2005) [89] este último composto é ainda descrito como possuidor de um aroma a mel e fruta.

Tabela 13 – Concentrações médias (*C*) dos compostos voláteis minoritários de interesse detetados nas amostras dos vinhos por análise semiquantitativa por GC-MS, associados aos respetivos limiares de perceção olfativa (*LPO*), relativamente a algumas das estirpes avaliadas, com o respetivo desvio-padrão

		<i>C</i> /($\mu\text{g/L}$)						
Componente	<i>LPO</i> $\mu\text{g/L}$	Y3	Y4	Y5	Y6	Y8	Lalvin QA23®	
Álcoois Monoterpénicos	citronelol	18 ^a	8,1 ± 0,4	6,2 ± 5,4	6,5 ± 4,0	n.d.	n.d.	10,0 ± 2,8
	butirato de etilo	20 ^b	228,5 ± 6,3	306,7 ± 49,9	226,4 ± 23,1	274 ± 24,1	230,4 ± 9,1	276,0 ± 26,8
Ésteres Etilícos de	hexanoato de etilo	14 ^c	551,6 ± 68,5	909,3 ± 112,7	431,0 ± 19,9	535,0 ± 117,3	568,7 ± 164,9	771,5 ± 29,0
	Ácidos Gordos	octanoato de etilo	5 ^c	562,3 ± 50,6	967,4 ± 28,8	550,8 ± 15,2	937,6 ± 42,8	802,3 ± 18,7
decanoato de etilo		200 ^c	68,6 ± 3,4	112,7 ± 95,2	59,5 ± 9,1	101,2 ± 42,6	100,2 ± 28,5	91,2 ± 3,1
Acetatos de Álcoois Superiores	acetato de isoamilo	30 ^b	1 740,1 ± 216,3	2 706,5 ± 327,5	990,4 ± 84,4	2 661,7 ± 388,5	2 266,2 ± 536,3	1 725,3 ± 144,7
	acetato de 2-feniletilo	250 ^b	132,6 ± 12,0	191,8 ± 14,4	81,0 ± 5,7	305,1 ± 11,3	246,2 ± 8,7	126,9 ± 2,7
Ácidos Gordos Voláteis	ácido propanoico	8 100 ^a	12,2 ± 2,9	9,5 ± 1,2	10,1 ± 1,3	3,0 ± 0,4	4,7 ± 0,6	11,5 ± 3,5
	ácido isobutírico	2 300 ^c	72,4 ± 20,4	98,6 ± 9,1	75,1 ± 29,8	46,4 ± 3,4	50,3 ± 3,2	47,7 ± 1,0
	ácido butírico	33 ^a	34,1 ± 1,3	101,1 ± 13,2	103,4 ± 28,8	51,5 ± 7,8	18,6 ± 2,2	40,1 ± 1,6
	Ácidos 2+3-metilbutírico	173 ^d	68,3 ± 9,3	80,6 ± 11,6	103,5 ± 31,8	124,0 ± 2,8	113,5 ± 67,2	79,3 ± 0,4
	ácido hexanoico	420 ^c	84,5 ± 4,0	1 094,8 ± 154,5	616,1 ± 65,2	110,5 ± 12,0	1 046,3 ± 83,9	1 452,4 ± 46,1
	ácido octanoico	500 ^c	3 455,7 ± 366,7	4 897,5 ± 300,5	2 896,6 ± 221,5	2 654,2 ± 144,5	2 859,7 ± 136,7	4 926,9 ± 205,3
	ácido decanoico	1 000 ^c	1 258,8 ± 44,9	1 505,0 ± 116,0	539,0 ± 36,7	815,2 ± 90,8	813,7 ± 77,4	1 289,0 ± 46,7
Álcoois	Metionol	500 ^e	100,5 ± 26,2	117,1 ± 28,2	137,3 ± 4,6	230,0 ± 6,2	278,8 ± 74,6	151,4 ± 0,5
Fenóis Voláteis	4-vinilguaicol	40 ^c	195,0 ± 7,1	273,5 ± 78,5	232,5 ± 10,6	269,0 ± 8,5	246,0 ± 19,8	224,0 ± 4,2
	4-vinilfenol	180 ^b	165,3 ± 0,4	202,1 ± 5,4	149,3 ± 20,8	211,3 ± 14,6	304,3 ± 18,7	189,6 ± 3,6

a – Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) [31]; b – Guth *et al.* (1997) [78]; c – Ferreira *et al.* (2000) [86]; d – Vilanova *et al.* (2013) [87]; e – Siebert *et al.* (2005) [82]; f – Moreno *et al.* (2005) [81]; g – Boidron *et al.* (1988) [90]; n.d. – não detetado

Tabela 13 – Concentrações médias (*C*) dos compostos voláteis minoritários de interesse detetados nas amostras dos vinhos por análise semiquantitativa por GC-MS, associados aos respetivos limiares de perceção olfativa (*LPO*), relativamente a algumas das estirpes avaliadas, com o respetivo desvio-padrão (Continuação)

		<i>C</i> /($\mu\text{g/L}$)						
Componente	$\frac{LPO}{\mu\text{g/L}}$	Y10	Y12	Y14	Y15	Y17	Y18	
Álcoois Monoterpénicos	citronelol	18 ^a	n.d.	n.d.	6,0 \pm 4,2	n.d.	4,1 \pm 1,4	5,3 \pm 2,9
	butirato de etilo	20 ^b	180,9 \pm 40,8	145,5 \pm 34,6	171,0 \pm 31,1	156,2 \pm 28,0	132,7 \pm 10,4	190,0 \pm 42,4
Ésteres Etilícos de Ácidos Gordos	hexanoato de etilo	14 ^c	449,7 \pm 6,6	477,9 \pm 70,9	503,9 \pm 40,9	509,3 \pm 110,7	315,1 \pm 2,8	430,2 \pm 24,3
	octanoato de etilo	5 ^c	264,5 \pm 12,1	181,1 \pm 76,2	449,3 \pm 43,5	170,1 \pm 7,1	102,3 \pm 0,4	209,6 \pm 12,1
	decanoato de etilo	200 ^c	27,7 \pm 3,3	15,5 \pm 0,7	46,9 \pm 8,6	8,3 \pm 1,0	24,5 \pm 2,1	20,0 \pm 1,4
Acetatos de Álcoois Superiores	acetato de isoamilo	30 ^b	2 303,3 \pm 242,9	1 994,7 \pm 38,7	1 259,6 \pm 121,1	1 088,7 \pm 96,7	1 393,0 \pm 79,1	1 423,2 \pm 7,4
	acetato de 2-feniletilo	250 ^b	177,0 \pm 17,0	145,7 \pm 8,9	82,6 \pm 19,2	81,5 \pm 21,8	197,8 \pm 0,3	126,9 \pm 5,8
Ácidos Gordos Voláteis	ácido propanoico	8 100 ^e	10,4 \pm 0,2	25,0 \pm 4,2	7,6 \pm 0,8	9,5 \pm 4,4	15,5 \pm 2,2	8,2 \pm 0,6
	ácido isobutírico	2 300 ^c	78,8 \pm 5,3	38,0 \pm 8,4	21,5 \pm 4,9	85,4 \pm 16,5	63,3 \pm 15,2	103,4 \pm 4,3
	ácido butírico	33 ^d	31,4 \pm 3,3	18,4 \pm 2,3	19,2 \pm 8,8	31,7 \pm 2,3	53,9 \pm 6,9	31,5 \pm 2,1
	Ácidos 2+3-metilbutírico	173 ^d	65,0 \pm 1,4	46,0 \pm 11,3	35,0 \pm 1,1	91,0 \pm 9,9	94,1 \pm 4,4	22,1 \pm 3,0
	ácido hexanoico	420 ^c	867,2 \pm 158,7	585,7 \pm 173,0	781,5 \pm 118,0	621,5 \pm 157,7	527,0 \pm 8,4	876,5 \pm 26,2
	ácido octanoico	500 ^c	3 341,2 \pm 41,3	2 715,5 \pm 279,4	3 245,4 \pm 404,7	1 652,3 \pm 185,7	1 968,5 \pm 21,8	2 940,5 \pm 33,2
	ácido decanoico	1 000 ^c	525,4 \pm 16,5	390,3 \pm 50,6	873,6 \pm 44,6	856,5 \pm 21,9	328,6 \pm 44,5	215,8 \pm 13,8
Álcoois	Metionol	500 ^f	79,2 \pm 17,3	59,5 \pm 5,0	45,8 \pm 13,8	40,7 \pm 6,2	132,5 \pm 24,8	76,4 \pm 3,2
Fenóis Voláteis	4-vinilguaiacol	40 ^c	190,0 \pm 39,6	224,0 \pm 48,1	324,5 \pm 75,7	615,5 \pm 154,4	189,0 \pm 4,2	256,5 \pm 68,6
	4-vinilfenol	180 ^g	173,5 \pm 3,5	205,1 \pm 76,3	165,2 \pm 31,3	196,1 \pm 14,3	165,5 \pm 7,8	460,5 \pm 57,5

a – Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) [31]; b – Guth *et al.* (1997) [78]; c – Ferreira *et al.* (2000) [86]; d – Vilanova *et al.* (2013) [87]; e – Siebert *et al.* (2005) [82]; f – Moreno *et al.* (2005) [81]; g – Boidron *et al.* (1988) [90]; n.d. – não detetado

No grupo dos ácidos gordos destacam-se o ácido butírico, o ácido hexanoico, o ácido decanoico e o ácido octanoico, devido às concentrações que apresentam nos vinhos elaborados. As estirpes Y3, Y4, Y5, Y6, Y17 e a estirpe comercial Lalvin QA23® apresentaram uma concentração de ácido butírico acima do respetivo *LPO*, tendo impacto no produto final. Os descritores associados a este composto são o odor a suor, ranço e queijo (Tabela 14). O ácido hexanoico foi encontrado acima do *LPO* em quase todos os vinhos, com exceção do vinho produzido pelas estirpes Y3 e Y6. O ácido decanoico, teve o seu *LPO* ultrapassado pelas estirpes Y3, Y4 e a comercial Lalvin QA23®. O principal composto em todos os vinhos brancos foi o ácido octanoico, que foi encontrado em todos os vinhos numa concentração bem acima do seu *LPO*. A maior concentração encontrada nos vinhos produzidos foi pela estirpe comercial Lalvin QA23® e pela estirpe Y4.

Tabela 14 – Descrição olfativa dos compostos voláteis minoritários detetados e quantificados

Componente	Descritor Olfativo
Álcoois Monoterpénicos	citronelol Citronela ^a
Ésteres Etilícos de Ácidos Gordos	butirato de etilo Fruta ^b , papaia ^c , manteiga ^c , <i>tutti-frutti</i> ^d , cera ^d e doce ^d
	hexanoato de etilo Fruta ^b , maçã verde ^e , anis ^f e ananás ^d
	octanoato de etilo Fruta ^b , fresco ^b , doce ^e , sabão ^e , anis ^f , cera ^d e pera ^d
	decanoato de etilo Agradável ^e , sabão ^e , fruta ^d , doce ^d e maçã ^d
Acetatos de Álcoois Superiores	acetato de isoamilo Banana ^b , fruta ^d , doce ^d , solvente ^d
	acetato de 2-feniletilo Floral ^b , mel ^g , rosas ^c , fruta ^d , tropical ^d , doce ^d
Ácidos Gordos Voláteis	ácido isobutírico Ranço ^e e queijo ^e
	ácido butírico Queijo ^b , suor ^h e ranço ^e
	Ácido 3-metilbutírico Gordura ^b , ranço ^b , queijo ^e
	Ácido 2-metilbutírico Suor ^e e queijo ^e
	ácido hexanoico Relva ^b , suor ^e e queijo ^f
	ácido propanoico Vinagre ^e
	ácido octanoico Gordura ^b , desagradável ^f , ranço ^e , áspero ^e , oleoso ^d e vegetal ^d
	ácido decanoico Gordura ^e , desagradável ^d , azedo ^d e rançoso ^d
Álcoois	Metionol Vegetais cozidos ^f
Fenóis Voláteis	4-vinilguaiacol Fumo ^e , dente de alho ^c e caril ^c
	4-vinilfenol Casca de amêndoa ^b

a – Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) [31]; b – Escudero *et al.* (2004) [79]; c – Vilanova *et al.* (2013) [87]; d – Vararu *et al.* (2016) [91]; e – Siebert *et al.* (2005) [82]; f – Culleré *et al.* (2004) [83]; g – Swiergers *et al.* (2005) [89]; h – Czerny *et al.* (2008) [84].

Os ésteres etílicos de ácidos gordos apresentados na Tabela 13, contribuem de uma forma geral com um aroma a fruta (excepto o decanoato de etilo) [79]. Culleré et al. (2004) [83] descrevem o hexanoato de etilo e o octanoato de etilo com um aroma a anis, e de acordo com Siebert et al. (2005) [82] o decanoato de etilo e o octanoato de etilo possuem um aroma agradável (ver Tabela 14). Segundo a Tabela 13, as concentrações dos ésteres etílicos de ácidos gordos ultrapassam largamente o seu *LPO*, com exceção do decanoato de etilo que se manteve sempre inferior. Estes ésteres contribuíram significativamente para o descritor frutado, que se destacou durante a análise sensorial.

O metionol está associado a descritores como couve-flor e vegetais cozidos (Tabela 14). Contudo, nenhum dos vinhos apresentou uma concentração acima do seu *LPO*, que é de 500 µg/L. Pode dizer-se que todos os vinhos produzidos apresentaram concentrações bastante aquém do *LPO* descrito para este composto, e conseqüentemente este não contribuiu de forma expressiva para o aroma dos vinhos.

No vinho estão presentes diversos ácidos, mas os ácidos gordos são descritos como os mais suscetíveis a contribuir para o aroma do vinho, sendo descrito com odores considerados negativos [25]. Considera-se que a sua origem provém principalmente dos processos biossintéticos levados a cabo por leveduras e bactérias durante a fermentação [87]. Os ácidos apresentados na Tabela 13 são caracterizados com um aroma a ranço e a queijo, nomeadamente o ácido 2-metilpropanoico (ácido isobutírico), o ácido butírico, os ácidos 2-metilbutírico e 3-metilbutírico, o ácido hexanoico e o ácido octanoico [82,84,91]. De acordo com Culleré et al. (2004) [83], o ácido decanoico e o ácido octanoico possuem um aroma a gordura. O ácido propanoico é descrito ainda como possuidor de um aroma a vinagre de acordo com Siebert et al. (2005) [82] (Tabela 14).

Por último, em relação aos fenóis voláteis identificaram-se o 4-vinilguaiaicol e o 4-vinilfenol. Estes possuem um limiar de perceção relativamente baixo, sendo, portanto, facilmente detetados nos vinhos. Os valores de 4-vinilguaiaicol, segundo a Tabela 13, encontram-se compreendidos entre 189,0 µg/L e 616,5 µg/L. O limiar de perceção deste composto é de 40 µg/L [87], pelo que todos os vinhos produzidos apresentam concentrações bem acima de *LPO*, contribuindo assim de forma significativa para o perfil sensorial. Segundo Escudero *et al.* (2004) [79] o 4-vinilguaiaicol possui um aroma a fumo.

Relativamente ao 4-vinilfenol, as concentrações em todos os vinhos produzidos encontram-se compreendidos entre 149,3 µg/L e 460,5 µg/L (Tabela 13). Ele é descrito por Escudero *et al.* (2004) [79] e por Culleré *et al.* (2004) [83] como tendo um aroma a casca de amêndoa. O seu limiar de perceção é de 180 µg/L [90], pelo que os vinhos produzidos pelas estirpes Y3, Y5, Y10, Y14 e Y17 foram os únicos que apresentaram concentrações inferiores ao *LPO* do composto.

4.4 Caraterização sensorial dos vinhos

Como referido no Ponto 2.5 (Capítulo II), o exame organolético é composto por 3 etapas: exame visual, exame olfativo e exame gustativo. Geralmente o exame inicia-se com o exame visual, passando para o exame olfativo e termina-se com o exame gustativo [26]. Por este motivo, a discussão e a apresentação dos resultados relativos à análise sensorial, serão divididos e apresentados por essa ordem.

Exame Visual

O exame visual foi o primeiro a ser realizado relativamente a todos os vinhos da prova. A visão permitiu avaliar a cor e a limpidez do vinho, as escalas dos parâmetros, eram de 0 (incolor) a 4 (topázio) e de 0 (turvo) a 5 (cristalino), respetivamente. Os resultados obtidos do exame visual encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 – Medianas dos valores obtidos do exame visual dos vinhos brancos, pelos 5 provadores

	Y3	Y4	Y5	Y6	Y8	Lalvin QA23®	Y10	Y12	Y14	Y15	Y17	Y18
Cor	4	3	3	3	2	3	4	3	3	3	3	3
Limpidez	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Analisando a Tabela 15, a mediana das classificações dos provadores atribuiu os vinhos Y3 e Y10 com cor topázio, os vinhos Y8 com cor amarelada (palha) e os restantes vinhos com uma cor dourada. Em relação à limpidez, todos os vinhos em estudos foram classificados como límpidos (escala 4). Tais resultados já eram esperados, uma vez que os vinhos em questão não

sofreram qualquer etapa de filtração ou clarificação, sendo assim improvável atingirem os valores máximos desta categoria, ou seja, cristalinos.

Exame Olfativo

No exame olfativo foi solicitada a avaliação de sete parâmetros: intensidade, floral, frutado, fruto seco, mineral, vegetal e impressão geral. As escalas dos parâmetros, eram de 0 (não foi identificado o descritor) a 5 (o descritor estava bastante presente), com exceção do parâmetro impressão geral e intensidade. Em relação à intensidade, a escala de 0 a 5 tinha uma tradução própria, que estava descrita na folha de prova (Ponto 3.5 Capítulo III), e a impressão geral era cotada de 0 a 5, onde 0 era a nota mínima e 5 a nota máxima. Na Tabela 16 são apresentadas as medianas da impressão geral do exame gustativo por parte dos 5 provadores.

Tabela 16 – Medianas dos valores obtidos da impressão geral do exame olfativo dos vinhos brancos, pelos 5 provadores

	Y3	Y4	Y5	Y6	Y8	Lalvin QA23®	Y10	Y12	Y14	Y15	Y17	Y18
Impressão Geral	2	2	2	1	2	3	2	2	2	2	2	2

Relativamente ao parâmetro da impressão geral, verifica-se que a estirpe comercial Lalvin QA23® foi a mais apreciada por parte dos provadores. As restantes estirpes mostraram-se bastante idênticas no que diz respeito à apreciação global, mas sempre inferior ao vinho conduzido pela estirpe comercial. Parece ter existido a produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S) (odor característico a ovos podres) de forma excessiva pela estirpe Y6, sendo também notável a sua presença noutros vinhos, contudo de forma menos significativa. Este deve ter sido o motivo principal, pelo qual a estirpe Y6 foi a menos apreciada do conjunto. De uma forma geral, estas avaliações negativas podem estar associadas às elevadas concentrações de compostos voláteis, relativamente ao *LPO*, com cheiros considerados negativos, como o caso dos ácidos gordos.

Os resultados dos restantes parâmetros avaliados no exame olfativo encontram-se na Figura 27, onde se verifica que os descritores Floral e Frutado foram os mais citados nos vinhos em estudo. Estes resultados são suportados pelas análises cromatográficas, dado que os ésteres, os álcoois superiores e os seus acetatos estão presentes de forma significativa, contribuindo com

notas frutadas para o perfil sensorial. Em contraste, os descritores Vegetal, Fruto Seco e Mineral foram os menos encontrados. Denota-se que os vinhos apresentaram intensidades semelhantes.

As estirpes Y3, Y15, Y18 e a estirpe comercial Lalvin QA23® apresentaram os descritores Floral e Frutado como predominantes. Contudo, a estirpe comercial Lalvin QA23® apresentou esses mesmos descritores de uma forma mais acentuada do que qualquer outra estirpe. A estirpe Y4 destacou-se, nos descritores Fruto Seco, Mineral e Vegetal, apresentando também o descritor Floral. Em relação à intensidade, todos os vinhos obtiveram classificações semelhantes, à exceção das estirpes Y4 e Y14 que obtiveram avaliações inferiores.

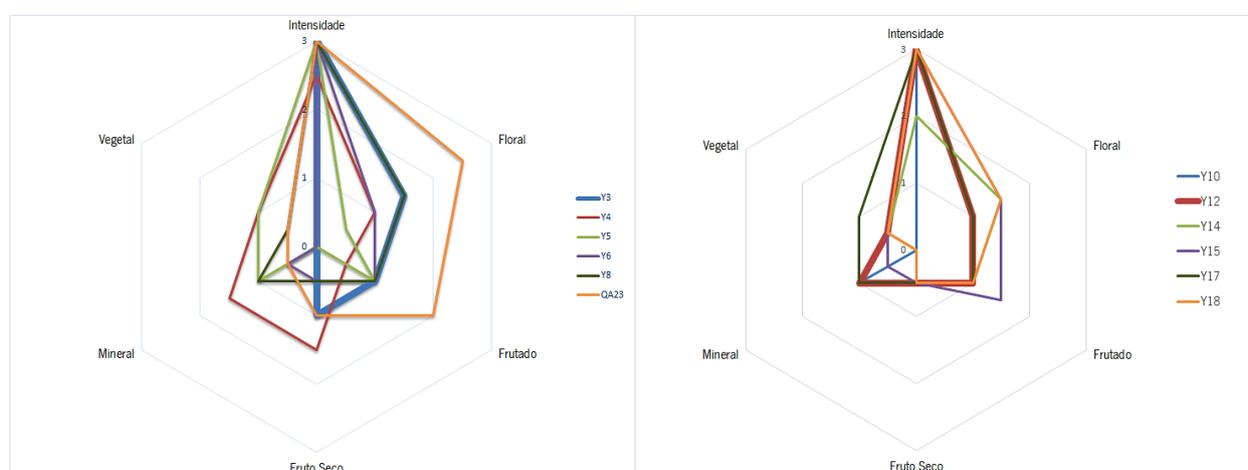


Figura 27 – Medianas dos valores obtidos do exame olfativo dos vinhos brancos, pelos 5 provadores.

Exame Gustativo

No que concerne ao exame gustativo teve-se em conta seis parâmetros: a doçura, a acidez, o amargor, a persistência, o equilíbrio e a impressão geral. As escalas dos parâmetros, eram de 0 (não foi identificado o descritor) a 5 (o descritor estava bastante presente). Na Tabela 17 estão as medianas das classificações dos provadores em relação à impressão geral. Os resultados obtidos do exame gustativo, em relação aos restantes parâmetros, encontram-se na Figura 28.

Tabela 17 – Medianas dos valores obtidos da impressão geral do exame gustativo dos vinhos brancos, pelos 5 provadores

	Y3	Y4	Y5	Y6	Y8	Lalvin QA23®	Y10	Y12	Y14	Y15	Y17	Y18
Impressão Geral	2	2	2	2	1	3	2	1	2	2	2	1

Relativamente ao parâmetro da impressão geral, verifica-se que a estirpe comercial Lalvin QA23® foi a mais apreciada por parte dos provadores, assim como no exame olfativo. As restantes estirpes mostraram-se bastante idênticas neste parâmetro, mas sempre inferior ao vinho conduzido pela estirpe comercial. Os vinhos da estirpe Y8, Y12 e Y18 foram os menos apreciados do conjunto, obtendo uma classificação bastante baixa.

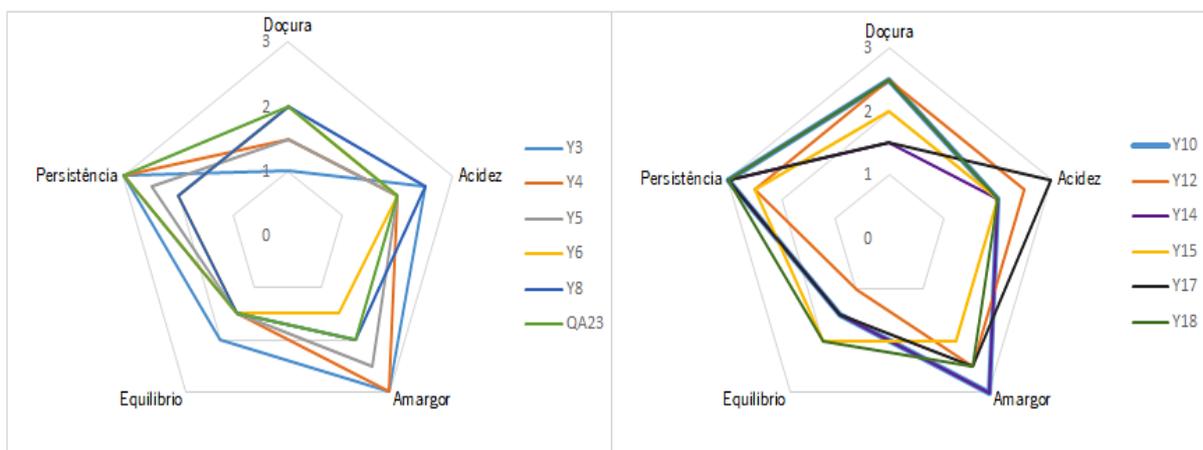


Figura 28 – Medianas dos valores obtidos do exame gustativo dos vinhos brancos, pelos 5 provadores

Pela análise da Figura 28, destacam-se os vinhos das estirpes Y10, Y12 e Y18 no descritor Doçura. Esta avaliação vai, em parte, ao encontro dos resultados obtidos por HPLC na quantificação de açúcares (ponto 4.3.1 do presente capítulo). A estirpe que apresentou maior concentração de açúcar foi a estirpe Y12, seguida pela estirpe Y10, e de facto no exame gustativo destacaram-se nesse parâmetro. Contudo o vinho produzido pela estirpe Y18 possui uma concentração de açúcares baixa, nem fazendo parte do grupo de vinhos classificados como adamados (Y14, Y10, Y5 e Y12). A estirpe Y3 foi a única que apresentou uma classificação de 1 no atributo Doçura, e de facto, pela análise por HPLC era uma das estirpes que possuía uma menor concentração de açúcares. Contudo, a estirpe comercial foi a que apresentou o valor mais baixo, pelo que a análise sensorial não foi concordante com a análise por HPLC.

Relativamente aos descritores Acidez e Amargor destacam-se as estirpes Y3, Y8, Y12 e Y17 e as estirpes Y3, Y4, Y10 e Y14, respetivamente, por apresentarem valores mais elevados nesses descritores. A nível da acidez, as estirpes que se destacaram foram as que apresentaram um maior valor de acidez total quantificado por FTIR (ponto 4.3.3 do presente capítulo). O amargor dos vinhos provém essencialmente dos compostos fenólicos das uvas [26]. Contudo, o mosto

utilizado foi sempre o mesmo, pelo que é improvável que existam conteúdos distintos de substâncias amargas. Contudo, o amargor também pode vir da oxidação do vinho e/ou de um maior teor em acetaldeído. De facto, as estirpes Y3, Y4, Y5, Y10 e Y15 apresentaram um cheiro de oxidação durante a prova, e a estirpe Y14 é uma das estirpes que possuiu uma concentração de acetaldeído acima do seu *LPO* (ponto 4.3.5 do presente capítulo).

Finalmente, em relação à Persistência e Equilíbrio, destacaram-se as estirpes Y3, Y4, Lalvin QA23®, Y10, Y17 e Y18 e as estirpes Y3, Y15 e Y18, respetivamente. Em relação à persistência, os resultados não foram muito distintos. No equilíbrio destaca-se negativamente a estirpe Y12, sendo a que obteve a menor classificação.

Apreciação Global

Cada vinho foi avaliado por cada provador numa escala de 0 a 20. Os resultados foram organizados na Tabela 18, onde é possível consultar as medianas das avaliações de cada vinho produzido.

O vinho que obteve uma melhor classificação por parte dos provadores foi o da estirpe comercial Lalvin QA23®, que foi avaliado com 10,0 (Suficiente). Destacou-se também a estirpe Y15 que obteve uma nota de 9,9, bastante próximo da avaliação da estirpe comercial. O vinho menos apreciado foi o da estirpe Y6, tal pode dar-se ao facto de que neste vinho era bastante evidente o cheiro a ovos podres, influenciando a nota final do mesmo. Regra geral, os vinhos foram quase todos classificados como medíocres, tal já era esperado dado que as impressões gerais nos exames visual e gustativo foram relativamente baixas.

Tabela 18 – Medianas dos valores obtidos da nota final dos vinhos brancos, pelos 5 provadores

	Y3	Y4	Y5	Y6	Y8	Lalvin QA23®	Y10	Y12	Y14	Y15	Y17	Y18
Nota Final	8,6	7,6	7,7	6,8	8,4	10,0	7,8	7,7	7,2	9,9	7,5	8,1

A qualidade de um vinho é influenciada por vários fatores, incluindo a levedura utilizada, o mosto e as práticas de vinificação [2]. Dado que todos os vinhos obtiveram uma nota final baixa, incluindo o vinho produzido pela estirpe comercial Lalvin QA23®, e as condições de vinificação foram controladas e idênticas para todos os vinhos, tal resultado se pode dever à matéria-prima, o mosto. O mosto utilizado neste trabalho não era fresco, assim o que conduziu a estes resultados

foi, provavelmente, o facto de ter sido usado mosto concentrado. No mosto de uva pode-se considerar a existência de três grupos funcionais: nutrientes, precursores de aroma e compostos ativos não-precusores. A ação das leveduras em muitos destes compostos é que permite a complexa variabilidade química do vinho, atuando a nível da aparência, aroma, sabor e sensação da boca [34]. Assim, apesar de as leveduras terem uma grande influência no resultado final, se o mosto não for de qualidade o vinho também não o será.

Capítulo V – Conclusões e Recomendações

5.1 Principais conclusões

O trabalho de dissertação teve como principal objetivo avaliar a aptidão enológica de onze estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* previamente selecionadas. Para tal foi necessário acompanhar a fermentação alcoólica e analisar os vinhos produzidos. O mosto utilizado nas fermentações foi sempre o mesmo, permitindo demonstrar que alterando somente a estirpe de levedura no processo de vinificação, é possível obter vinhos com diferentes perfis sensoriais.

No que diz respeito à monitorização das fermentações, destacaram-se as estirpes Y14 e a comercial Lalvin QA23® pela reduzida produção de espuma ao longo de todo o processo de fermentação. Em contrapartida as estirpes Y12 e Y17 tiveram uma produção excessiva de espuma. Por este ponto, estas estirpes não seriam as mais indicadas a utilizar em adegas. Em relação à cinética de fermentação, a estirpe comercial Lalvin QA23® foi a que apresentou uma cinética mais rápida, demorando somente 8 d. A estirpe Y14 foi a única capaz de a acompanhar, dado que demorou somente mais algumas horas. A estirpe mais demorada foi a Y12, terminando a fermentação ao fim de 15 d. Por fim, a nível do aroma do mosto em fermentação, destacaram-se as estirpes Y3, Y6, Y10, Y14 e Y18 que apresentaram um aroma frutado durante a maior parte do tempo de fermentação. Também a estirpe comercial Lalvin QA23® manteve o seu aroma a fruta citrina durante os 8 d de fermentação. Em contrapartida, as estirpes Y5 e Y15 foram as que mais evidenciaram defeito a nível sensorial, possuindo um cheiro que lembrava ovos podres durante grande parte do tempo de fermentação.

A maioria dos vinhos foram classificados como vinhos secos. Somente os vinhos Y5, Y10, Y12, Y14 e Y17 foram classificados como vinhos adamados. Em relação ao título alcoométrico volúmico, os vinhos produzidos apresentaram valores compreendidos entre 11,7 % e 13,3 %, pelas estirpes Y15 e a comercial Lalvin QA23®, respetivamente. Concluindo, todas as estirpes foram capazes de degradar os açúcares presentes no mosto, produzindo etanol.

Os compostos 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e o 2-feniletanol, destacaram-se na quantificação dos álcoois superiores, dado que foram encontrados em todos os vinhos, com valores acima do seu limiar de perceção olfativa. Apesar de os primeiros estarem associados a descritores considerados negativos, o 2-feniletanol está relacionado a atributos agradáveis. Os compostos voláteis minoritários, foram encontrados em concentrações bastante semelhantes,

relativamente a cada composto. Contudo, destacou-se o octanoato de etilo, que esteve presente em todos os vinhos em concentrações bastante superiores ao seu limiar de percepção olfativa, contribuindo com um aroma frutado, fresco e doce. No entanto, destacou-se também o ácido octanoico dado que em todos os vinhos foi ultrapassado em muito o limiar de percepção olfativa.

Na análise sensorial o vinho produzido pela estirpe comercial Lalvin QA23® foi o mais apreciado pelo painel de provadores. Contudo, a estirpe Y15 obteve uma classificação final bastante próxima da estirpe comercial. O vinho produzido por ambas as estirpes apresentou um perfil gustativo e olfativo semelhante. A nível visual, todos os vinhos foram classificados como límpidos e quase todos foram descritos com cor dourada. Por fim, destaca-se a estirpe Y17 pelo seu perfil olfativo diferencial, dado possuir notas dos diferentes descritores analisados de forma quase igualitária.

Todas as estirpes demonstraram potencial enológico, dado terem capacidade de fermentar em condições similares a uma adega. No entanto, a estirpe comercial Lalvin QA23® foi a mais promissora no exame sensorial. Obteve uma cinética de fermentação mais rápida e uma reduzida produção de espuma, ao longo de toda a fermentação alcoólica. Apesar de a estirpe Y15 se ter destacado no exame sensorial, obtendo resultados bem próximos da estirpe comercial, foi uma das estirpes com uma cinética de fermentação mais lenta.

5.2 Recomendações para trabalhos futuros

De forma a complementar o estudo das estirpes seria importante avaliar a sua aptidão em mostos tintos. Seria ainda aliciante, utilizar mostos frescos e cuja composição das castas fosse detalhada, dado que cada casta possuiu características únicas que contribuem para o perfil sensorial. No presente trabalho, não foi possível conhecer as castas presentes. Do mesmo modo, a avaliação das estirpes em mostos de diferentes regiões/castas iria produzir vinhos com perfis distintos, pelo que o resultado poderia ser bem diferente do apresentado neste trabalho.

Na vinificação de vinhos brancos é recomendado operar entre 15 °C e 20 °C. No presente estudo foi utilizada uma temperatura de 18 °C, mas seria interessante utilizar uma temperatura mais baixa, dado aí ocorrer a produção de vinhos brancos mais frutados (maior formação de ésteres) e mais ricos em CO₂ e menor perda de aromas de origem varietal.

Parece ter existido a produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S) (odor característico a ovos podres) de forma excessiva pela estirpe Y6, sendo também notável a sua presença noutros vinhos, contudo de forma menos significativa. Seria recompensador fazer a quantificação deste composto, de modo a selecionar estirpes de *S. cerevisiae* que não o produzam durante a fermentação alcoólica ou que produzam numa concentração inferior ao seu limiar de perceção olfativa, de forma a não sobressair o aroma a “ovos podres” nos vinhos produzidos.

Dado a solubilidade do ácido tartárico, recomenda-se que, sempre que possível, as análises físico-químicas sejam feitas sem a congelação, ou seja, analisar assim que se recolherem as amostras de vinho.

Referências Bibliográficas

- [1] S. C. Rasmussen, “*The Quest for Aqua Vitae – The History and Chemistry of Alcohol from Antiquity to the Middle Ages*,” Springer Briefs in Molecular Science – History of Chemistry, Londres, pp. 23, 2014.
- [2] M. Ciani, F. Comitini, I. Mannazzu & P. Domizio, “*Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking*” *FEMS Yeast Research*, vol. 10, n. 2, pp. 123–133, 2010.
- [3] Regulamento (CE) N.º 479/2008 do Conselho de 29 de Abril de 2008, “*Conselho da União Europeia*,” *Jornal Oficial da União Europeia*, vol. 148, pp. 42–46, 2008.
- [4] R. S. Jackson, “*Wine Science - Principles and Applications*,” Oxford, 3ª Edição, Reino Unido, 2008.
- [5] Vinalia, página WEB <http://www.vinalia.com.pt/>. Consultada em 17/10/2017.
- [6] Yeast Wine, página WEB <http://www.yeastwine.com/>. Consultada em 18/10/2017.
- [7] R. Jackson, “*Wine Tasting - A Professional Handbook*,” Elsevier, California (USA), 2002.
- [8] A. R. S. Rosado, “*Evolução de Parâmetros Físicos, Químicos e Controlo Microbiológico em Vinhos Brancos e Tintos da Adega Cooperativa de Palmela*,” Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciência e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, 2013.
- [9] C. S. F. Peixoto, “*Produção de compostos de enxofre por bactérias lácticas do vinho durante a fermentação maloláctica*,” Tese de Mestrado em Microbiologia Aplicada, Universidade Católica Portuguesa - Escola Superior de Biotecnologia, 2012.
- [10] I. S. Pretorius, T. J. van der Westhuizen & O. P. H. Augustyn, “Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry.,” *South African Journal of Enology and Viticulture*, vol. 20, n. 2, pp. 61–75, 1999.
- [11] L. D. Avila & C. E. Daudt, “*Indução da fermentação maloláctica em vinho Gewürztraminer*,” *Ciência Rural*, Santa Maria, vol. 27, n. 2, pp. 331–336, 1997.
- [12] A. Inês, T. Tenreiro, R. Tenreiro & A. Mendes-Faia, “*Revisão: As bactérias do ácido láctico do vinho - Parte I*,” *Ciencia e Téc. Vitiv.*, vol. 23, n. 2, pp. 81–96, 2008.
- [13] F. Zamora, “*Wine Chemistry and Biochemistry – Chapter 1: Biochemistry of Alcoholic Fermentation*,” Springer, Nova Iorque (USA), pp. 16–26, 2009.
- [14] Universidade de Adelaide, “*Curso Online - World of Wine: From Grape to Glass*,” página WEB <https://www.edx.org/course/world-wine-grape-glass-adelaidex-wine101x-2>. Consultado a 22/01/2017.
- [15] P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche & A. Lonvaud, “*Handbook of enology. Vol. 1. The Microbiology of Wine and Vinification*,” John Wiley & Sons, Ltd, Reino Unido, 2006.
- [16] L. Spadari, “*Influência da Cepa de Levedura na Composição de Vinhos Espumantes elaborados pelo Método Tradicional*,” Tese de Mestrado em Biotecnologias e Gestão Vitivinícolas. Universidade de Caxias do Sul, Rio de Janeiro, 2013.

- [17] J. T. Pronk, H. Y. Steensma & J. P. van Dijken, "*Pyruvate Metabolism in Saccharomyces cerevisiae*," John Wiley & Sons, Ltd, vol. 12, pp. 1607–1633, 1996.
- [18] C. Navarre, "*Enologia - Técnicas de Produção do Vinho*," Publicações Europa-América, LDA., 1997.
- [19] C. S. Souza, "*Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por um linhagem de S. cerevisiae*," Tese de Doutorado em Biotecnologia. Instituto Butantan, São Paulo, 2009.
- [20] M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo, "*Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends*," Critical Reviews in Food science and Nutrition, vol. 45, n. 4 pp. 265–286, Madrid, 2005.
- [21] L. C. M. Neves, "*Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando Saccharomyces cerevisiae W3033-181*," Tese de Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2003.
- [22] Â. S. M. Miguel, "*Produção de glicose-6-fosfato desidrogenase de Saccharomyces cerevisiae geneticamente modificada através de processo descontínuo alimentado*," Tese de Doutorado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas., 2006.
- [23] V. Jiranek, P. Langridge & P. A. Henschke, "*Amino acid and ammonium utilization by Saccharomyces cerevisiae wine yeast from a chemically defined medium*," American Journal of Enology and Viticulture, vol. 46, pp. 75–83, 1995.
- [24] C. Flanzy, "*Enologia: Fundamentos Científicos y tecnológicos*", Mundi Prensa, 2ª Edição, Madrid, 2003.
- [25] M. F. C. Lopes, "*Comportamento fermentativo de cinco estirpes autóctones de Saccharomyces cerevisiae em vinificação - estudo à escala piloto*," Tese de Mestrado em Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 2014.
- [26] A. Querol, M. T. Fernández-Espinar, M. Del Olmo, & E. Barrio, "*Adaptive evolution of wine yeast*," International Journal of Food Microbiology, vol. 11, n. 4, pp. 339–356, 2003.
- [27] A. M. Bortoletto, A. R. Alcarde, C. Carazzato, J. A. Mendonça & J. A. S. Filho, "*Produção de Vinho de Qualidade*," Casa do Produtor, São Paulo, 2015.
- [28] M. J. Torija, N. Rózes, M. Poblet, J. M. Guillamón & A. Mas, "Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*," International Journal of Food Microbiology, vol. 80, n. 1, pp. 47–53, 2003.
- [29] I. Sá-Correia & N. Van Uden, "*Temperature profiles of ethanol tolerance: Effects on ethanol on the minimum and maximum temperatures for growth of the yeasts Saccharomyces cerevisiae and Kluyveromyces fragilis*," Biotechnology and Bioengineering, vol. 25, pp. 1665, 1983.
- [30] T. Klein, "*Avaliação de aromas característicos produzidos por diferentes leveduras comerciais inoculadas no mosto da CV. Chardonnay*," Tese de Mestrado em Tecnologia em Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, 2006.

- [31] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, & D. Dubourdieu, "*Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*," John Wiley & Sons, Ltd, 2.^a Edição, Reino Unido, 2006.
- [32] C. Steckelberg, "*Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas*," Tese de Douturamento em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.
- [33] M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo, "*Wine chemistry and biochemistry*," Springer, Madrid, 2009.
- [34] S. Sartor, "*Caracterização química de uvas e vinhos Goethe produzidos na região de Urussanga-Santa Catarina*," Tese de Mestrados em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- [35] J. M. M. Oliveira, "*Aromas Varietais e de Fermentação Determinantes da Tipicidade das Castas Loureiro e Alvarinho*," Tese de Doutoramento em Engenharia Química e Biológica, Universidade do Minho, 2000.
- [36] Regulamento (CE) N.º 607/2009 do Conselho de 14 de Julho de 2009, "*Conselho da União Europeia*," Jornal Oficial da União Europeia, vol. 193, pp. 131, 2009.
- [37] IVV, página WEB [http://http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/np4/89/](http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/np4/89/). Consultado em 12 de Maio de 2017.
- [38] J. H. Swieger, E. J. Bartowsky, P. A. Henschke & I. S. Pretorius, "*Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour*," Australian Journal of Grape and Wine Research, vol. 11, n. 2, pp. 139–173, 2005.
- [39] L. A. Rizzon, A. Miele & J. Meneguzzo, "*Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto*," Ciência e Tecnologia Alimentar, vol. 20, n. 1, pp. 115–121, 2000.
- [40] M. D. C. A. Souza, "*Identificação, quantificação e comparação das substâncias químicas responsáveis pelos aromas da cachaça de alambique e do rum comercial tratados pelo processo de irradiação*," Tese de Doutoramento em Ciências e Tecnologia Nuclear, Universidade de São Paulo, 2006.
- [41] T. G. Stidwell, "*The use of enzymes for increased aroma formation in wine by*," Tese de Mestrado em Ciências, Universidade de Stellenbosch, África do Sul, 2001.
- [42] Regulamento (CE) N.º 606/2009 do Conselho de 10 de Julho de 2009, "*Conselho da União Europeia*," Jornal Oficial da União Europeia, vol. 193, pp. 48, 2009.
- [43] M. J. Cabrita, J. R. Silva & O. Kaurenko, "*Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos*," I Seminário Internacional de Vitivinicultura, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- [44] A. D. Cardoso, "*O Vinho - Da Uva à Garrafa*," Editora Âncora, Coimbra, 2007.
- [45] C. García-Jares, S. Garcia-Martin & R. Cela-Torrijos, "*Analysis of some highly volatile compounds of wine by means of purge and cold trapping injector capillary gas chromatography. Application to the differentiation of rias Baixas Spanish white wines*," Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 43, pp. 764, 1995.

- [46] M. P. Martí, M. Mestres, C. Sala, O. Busto & J. Guash, “*Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma,*” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, n. 27 pp. 786, 2003.
- [47] Z. Genisheva, “*Caracterização aromática varietal das castas brancas recomendadas para a produção de vinho verde,*” Tese de Mestrado em Engenharia Biológica. Universidade do Minho, 2007.
- [48] M. Ciani & F. Comitini, “*Non-Saccharomyces wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking,*” *Annals of Microbiology*, vol. 61, n. 1, pp. 25–32, 2011.
- [49] A. Couto, P. Gurak, C. Chiappini, M. Zanús, G. Silva, & S. Leite, “*Elaboração de vinho em culturas mistas de leveduras não-Saccharomyces isoladas de Jaca (Arthocarpus heterophyllus LAM) e Saccharomyces cerevisiae: Avaliações química e sensorial,*” *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, vol. 5, n. 2, pp. 500–515, Paraná, 2011.
- [50] L. F. Bisson, “*The Biotechnology of Wine Yeast,*” *Food Biotechnology*, vol. 18, n. 1, pp. 63–96, 2004.
- [51] M. Combina, A. Elía, L. Mercado, C. Catania, A. Ganga & C. Martinez, “*Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina,*” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 99, n. 3, pp. 237–243, 2005.
- [52] P. Romano, C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso & A. Capece, “*Function of yeast species and strains in wine flavour,*” *Internacional Journal of Food Microbiology*, vol. 86, n. 1–2, pp. 169–180, 2003.
- [53] W. F. C. Ferreira & J. C. F. Sousa, “*Microbiologia*”, LIDEL, pp. 80–97, 1998.
- [54] M. Pelczar, R. Reid & E. C. S. Chan, “*Microbiologia: Conceitos e Aplicações, Volume 1*”, Pearson, Brasil, 1996.
- [55] I. S. Pretorius & F. F. Bauer, “*Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains,*” *Trends in Biotechnology*, vol. 20, n. 10, pp. 426–432, 2002.
- [56] D. R. da S. McGuire, “*Seleção e caracterização de leveduras ‘starter’ a partir de populações autóctones de mosto,*” Tese de Mestrado em Microbiologia Aplicada, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, 2010.
- [57] E. Vieira, J. Neves, R. Machado, P. Silva, A. Gomes, S. Sousa, P. Ramos, F. Aemão, M. Lima, I. Araújo, F. Duarte, A. Santos, M. Casal & D. Schuller, “*A coleção de estirpes autóctones de Saccharomyces cerevisiae das principais regiões vitivinícolas Portuguesas,*” VIII Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, Évora, pp. 1–8, 2010.
- [58] A. D. M. Silva, “*Uso de Carboximetilcelulose na Estabilização Tartárica de Vinhos Verdes,*” Tese de Mestrado em Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 2014.
- [59] FOSS, “*OenoFoss™ – Instant quality control throughout the winemaking process*”, página WEB: <https://www.fossanalytics.com/en>. Consultado a 11/10/2017

- [60] J. Rodrigues, “*Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR)*,” Página WEB: <http://www.fciencias.com/2014/11/13/espectroscopia-de-infravermelhos-ftilaboratorio-online/>. Consultado a 11/10/2017.
- [61] R. B. Chust, “Introdução Cromatografia de Líquidos,” *Boletim SPQ*, vol. 39, pp. 43–54, 1990.
- [62] E. P. Tessaro, “*Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas - GC-MS*.” Tese de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, pp. 1–78.
- [63] ISO 5492:1992, “*International Standard: Sensory analysis - vocabulary*.” 1992.
- [64] ISO 6658:2005, “*International Standard ISO - Sensory analysis - Methodology - General guidance*.”, 2005.
- [65] S. E. Kemp, T. Hollowood, & J. Hort, “*Sensory Evaluation - A Practical Handbook*,” John Wiley & Sons, 1.ª Edição, 2009.
- [66] E. Peynaud, “*Enologia Prática - Conocimiento y Elaboracion del Vino*,” Ediciones Mundi-Prensa, 3.ª Edição, Madrid, 1989.
- [67] M. E. G. Vieira, “*Estirpe de Saccharomyces cerevisiae WO 2013153540 A1*,” Yeast Wine – Wine Solutions Lda., Patente, 2013.
- [68] J. M. Oliveira, M. Faria, F. Sá, F. Barros & I. M. Araújo, “*C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin*,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 563, no 1–2, pp. 300–309, 2006.
- [69] Z. Genisheva, M. Vilanova, S. I. Mussatto, J. A. Teixeira & J. M. Oliveira, “*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*, vol. 59, pp. 1114–1122, 2014.
- [70] W. F. Duarte *et al.*, “*Raspberry (Rubus idaeus L.) wine: Yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds*,” *Food Research International*, vol. 43, n. 9, pp. 2303–2314, 2010.
- [71] S. Marsit & S. Dequin, “*Diversity and adaptive evolution of Saccharomyces wine yeast: a review*,” *FEMS, Journals investing in science*, Edição de Julho, pp. 1–12, 2015.
- [72] M. Ugliano, P. A. Henschke, M. J. Herderich & I. S. Pretorius, “*Nitrogen management is critical for wine flavour and style*,” *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, vol. 22, n. 6, pp. 24–30, 2007.
- [73] J. Meneguzzo, L. A. Rizzon, A. Miele & M. A. Z. Ayub, “*Efeito de Botrytis cinerea na composição do vinho gewürztraminer*,” *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, vol. 26, n. 3, pp. 527–532, 2006.
- [74] F. D. O. N. Tomaz, “*Estudo da evolução dos compostos da uva ao longo da maturação em clima semi-árido*,” Tese de Mestrado em Viticultura e Enologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2013.
- [75] N. A. Bokulich & C. W. Bamforth, “*The Microbiology of Malting and Brewing*,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 2, n. 77, pp. 157–172, 2013.

- [76] Regulamento (CE) N.º 491/2009 do Conselho de 25 de Maio de 2009, “*Conselho da União Europeia*,” Jornal Oficial da União Europeia, vol. 154, pp. 39, 2009.
- [77] D. Delanoe, C. Maillard & D. Maisondieu, “*O vinho - da análise à elaboração*,” Publicações Europa-América, Portugal, 1987.
- [78] H. Guth, “*Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties*,” Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 45, n. 8, pp. 3027–3032, 1997.
- [79] A. Escudero, B. Gogorza, M. A. Melús, N. Ortín, J. Cacho & V. Ferreira, “*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, vol. 52, n. 11, pp. 3516–3524, 2004.
- [80] L. A. Rizzon & V. M. A. Sganzerla, “*Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS*,” Ciência Rural, vol. 37, n. 3, pp. 911–914, 2007.
- [81] J. A. Moreno, L. Zea, L. Moyano & M. Medina, “*Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing*,” Food Control, vol. 16, n. 4, pp. 333–338, 2005.
- [82] T. Siebert, H. Smyth, D. Capone, C. Neuwohner, K. Pardon, G. Shouroumounis, M. Herderich, M. Sefton & A. Pollnitz, “*Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS*,” Anal Bional Chemistry, vol. 381, n. 4, pp. 937–947, 2005.
- [83] L. Culleré, A. Escudero, J. Cacho & V. Ferreira, “*Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines*,” Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 52, n. 6, pp. 1653–1660, 2004.
- [84] M. Czerny, M. Christlbauer, M. Christlbauer & P. Schierberle, “*Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions*” European Food Research and Technology, vol. 228, n. 2, pp. 265–273, 2008.
- [85] M. R. Vlinana, J. M. Oliveira, J. A. Teixeira & W. G. Venturini Filho, “*Characterization of Brazilian Table Wines from American Varieties*,” XXXIV World Congress of Vine and Wine - Wine Construction, Edição de Junho, pp. 20–27, 2011.
- [86] V. Ferreira, R. López & J. F. Cacho, “*Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. An assessment of their sensory role*,” Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 80, n. 11, pp. 1659–1667, 2000.
- [87] M. Vilanova, Z. Genisheva, M. Graña & J. M. Oliveira, “*Determination of odorants in varietal wines from international grape cultivars (Vitis vinifera) grown in NW Spain*,” South African Journal of Enology and Viticulture, vol. 34, n. 2, pp. 212–222, 2013.
- [88] OIV – Organização Internacional da Vinha e do Vinho. Página web: <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/oenological-practices/maximum-acceptable-limits>, consultada em 07/10/2017.
- [89] J. H. Swieger, E. J. Bartowsky, P. A. Henschke & I. S. Pretorius, “*Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour*,” Australian Journal of Grape and Wine Research, vol. 11, n. 2, pp. 139–173, 2005.

- [90] J. N. Boidron, P. Chatonned & M. Pons, “*Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins,*” *Connaissance de la vigne et du vin*, vol. 22, n. 4, pp. 275–294, 1988.
- [91] F. Vararu, J. Moreno-García, C. Zamfir, V. V. Cotea & J. Moreno, “*Selection of aroma compounds for the differentiation of wines obtained by fermenting musts with starter cultures of commercial yeast strains*” *Food Chemistry*, vol. 197, pp. 373–381, 2016.

Anexos

A – Resultados da monitorização da fermentação alcoólica

A Figura A.1 apresenta os gráficos da variação da massa volúmica dos mostos em fermentação ao longo do tempo, relativamente a cada estirpe.

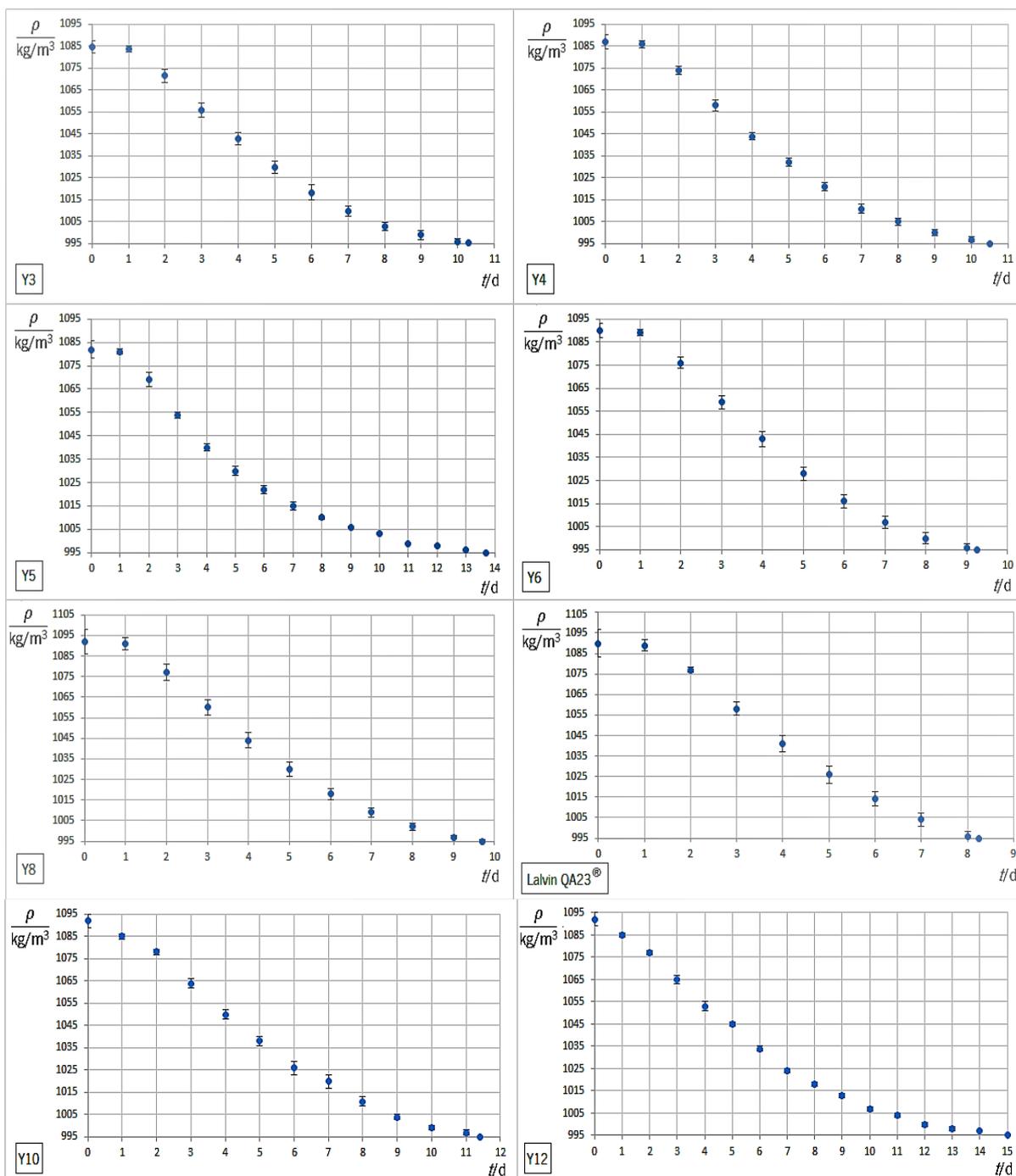


Figura A.1 – Perfil da variação da massa volúmica (ρ) e respetivo erro associado ($\rho = 0,05$), ao longo do tempo de fermentação (t), relativamente a cada estirpe.

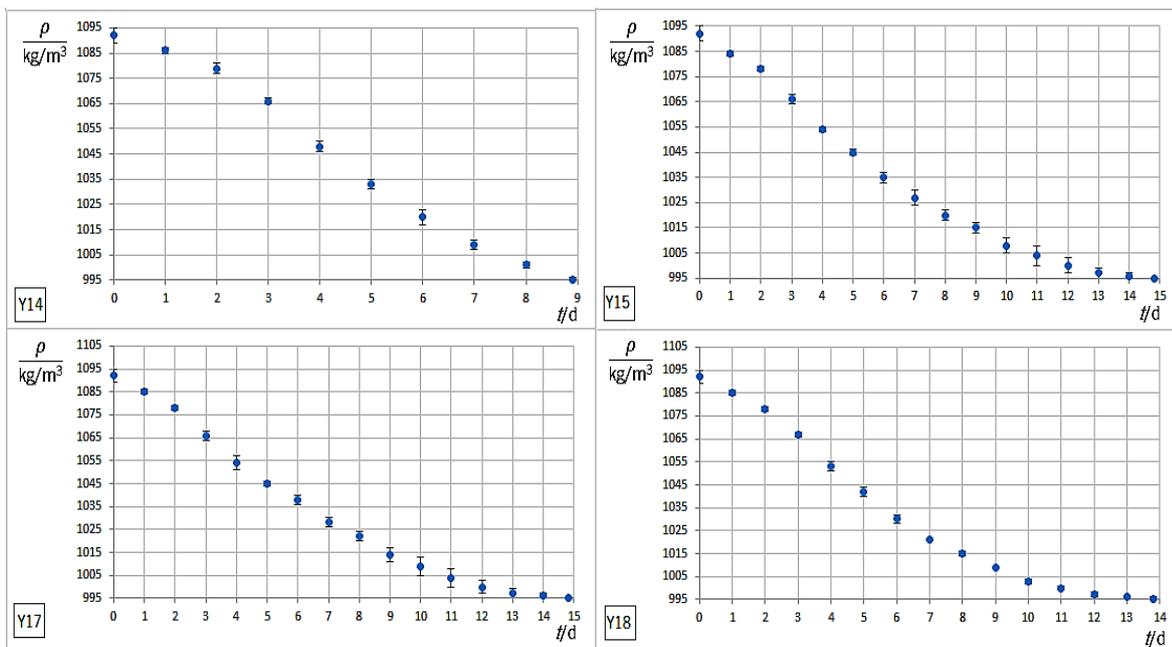


Figura A.1 – Perfil da variação da massa volúmica (ρ) e respetivo erro associado ($\rho = 0,05$), ao longo do tempo de fermentação (t), relativamente a cada estirpe. (Continuação).

A Figura A.2 apresenta os perfis da variação da concentração dos açúcares fermentescíveis (glucose + frutose) e do valor de TAV em função do tempo de fermentação.

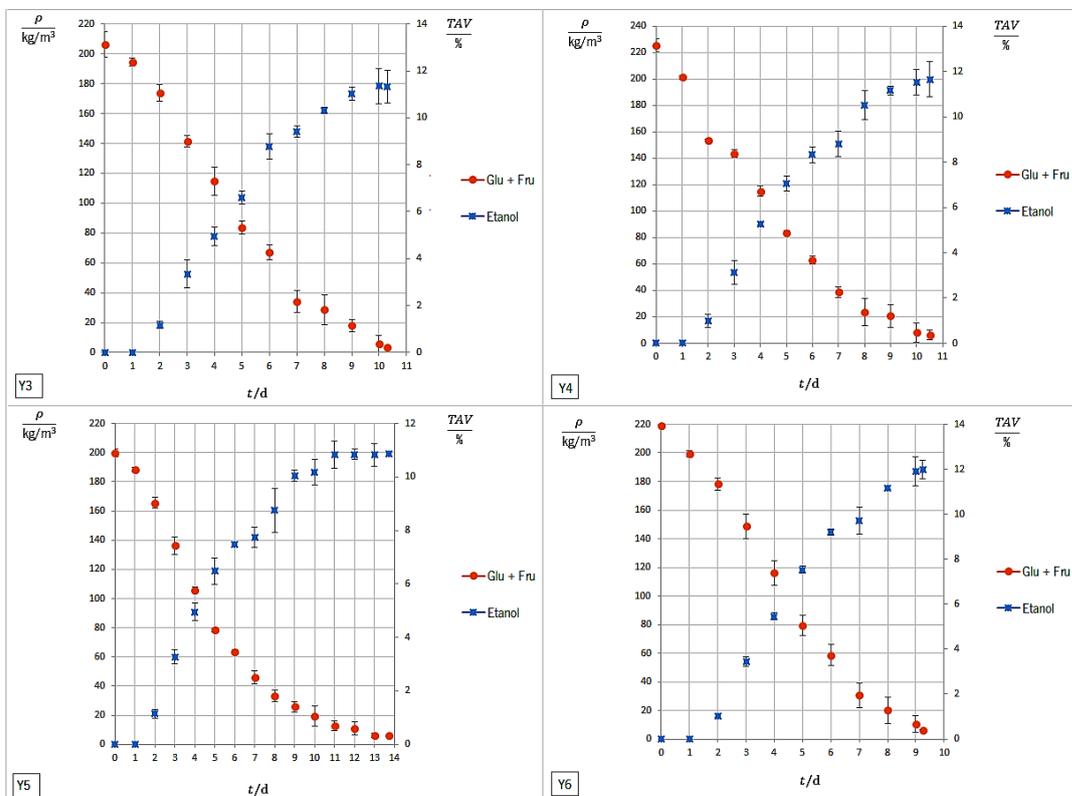


Figura A.2 – Variação da concentração de glucose + frutose ($C_{glu+fru}$) e do título alcoométrico volúmico (TAV), quantificados por FTIR, em função do tempo de fermentação (t), associado ao respetivo erro ($\rho = 0,05$), relativamente a cada estirpe.

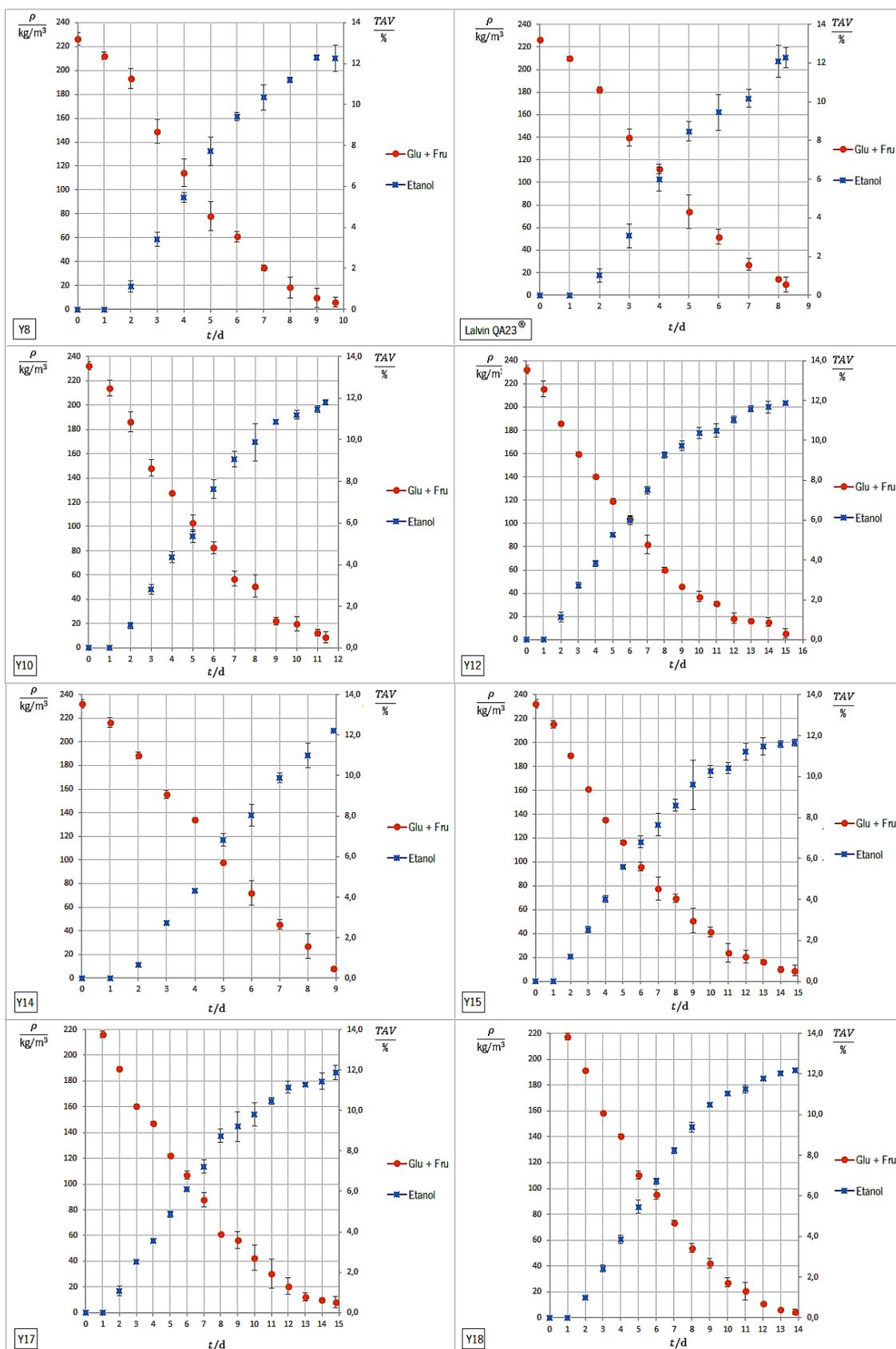


Figura A.2 – Variação da concentração de glicose + frutose ($C_{\text{glu+fru}}$) e do título alcoométrico volúmico (TAV), quantificados por FTIR, em função do tempo de fermentação (t), associado ao respetivo erro ($p = 0,05$), relativamente a cada estirpe. (Continuação).

B – Retas de calibração – HPLC

Para cada componente quantificado por HPLC foi necessário fazer uma curva de calibração. Na Tabela B.1 seguem-se as retas de calibração obtidas a partir da construção das curvas de calibração relativamente a cada componente, que foram necessárias para o doseamento dos diferentes constituintes do vinho.

Tabela B.1 – Curvas de calibração, que relacionam a área do pico cromatográfico (A) com a concentração (C), com um intervalo de confiança de 95 %, com o respetivo coeficiente de determinação (R^2) e limites usados

Composto	Reta de Calibração	R^2	Limites
Glucose	$\frac{A}{\text{mV s}} = (1226,8 \pm 113,2) \times \frac{C_{\text{Glu}}}{\text{g/L}} - (551,8 \pm 1069,8)$	0,9956	0 g/L a 15,6 g/L
Frutose	$\frac{A}{\text{mV s}} = (1206,7 \pm 137,4) \times \frac{C_{\text{Fru}}}{\text{g/L}} - (613,0 \pm 1280,1)$	0,9933	0 g/L a 15,4 g/L
Etanol	$\frac{A}{\text{mV s}} = (336,7 \pm 42,8) \times \frac{C_{\text{etanol}}}{\text{g/L}} - (769,3 \pm 1432,7)$	0,9948	0 g/L a 55,2 g/L
Glicerol	$\frac{A}{\text{mV s}} = (832,9 \pm 52,4) \times \frac{C_{\text{Gli}}}{\text{g/L}} - (80,1 \pm 161,5)$	0,9979	0 g/L a 5,1 g/L
Ácido Cítrico	$\frac{A}{\text{mV s}} = (366,2 \pm 357,1) \times \frac{C_{\text{Ác. Cítrico}}}{\text{g/L}} - (70,9 \pm 117,2)$	0,9951	0 g/L a 0,5 g/L
Ácido Tartárico	$\frac{A}{\text{mV s}} = (4989,4 \pm 480,3) \times \frac{C_{\text{Ác. Tartárico}}}{\text{g/L}} - (322,5 \pm 761,5)$	0,9952	0 g/L a 2,6 g/L
Ácido Málico	$\frac{A}{\text{mV s}} = (1964,3 \pm 86,1) \times \frac{C_{\text{Ác. Málico}}}{\text{g/L}} - (36,4 \pm 79,1)$	0,9990	0 g/L a 1,5 g/L
Ácido Succínico	$\frac{A}{\text{mV s}} = (1555,3 \pm 150,5) \times \frac{C_{\text{Ác. Succínico}}}{\text{g/L}} - (24,8 \pm 48,3)$	0,9952	0 g/L a 0,5 g/L