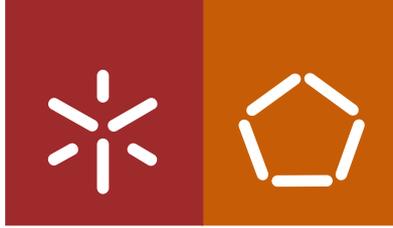


**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Marta Filipa Coelho Lopes

**Comportamento fermentativo de cinco estirpes autóctones de *Saccharomyces cerevisiae* em vinificação – estudo à escala piloto**



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Marta Filipa Coelho Lopes

**Comportamento fermentativo de cinco estirpes autóctones de *Saccharomyces cerevisiae* em vinificação – estudo à escala piloto**

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

Trabalho efetuado sob a orientação do  
**Professor Doutor José Maria Marques Oliveira**  
e da  
**Mestre Isabel Maria Morais Araújo**

outubro de 2014

## Declaração

**Autor:** Marta Filipa Coelho Lopes

**Endereço eletrónico:** [martafclopes@hotmail.com](mailto:martafclopes@hotmail.com)

**Título:** Comportamento fermentativo de cinco estirpes autóctones de *Saccharomyces cerevisiae* em vinificação – estudo à escala piloto

**Orientadores:** Professor Doutor José Maria Marques Oliveira  
Mestre Isabel Maria Morais Araújo

**Ano de conclusão:** 2014

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

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

Universidade do Minho, 27 de Outubro de 2014



## Agradecimentos

Este projeto não teria sido possível sem a colaboração de algumas pessoas e entidades que contribuíram de forma relevante para a execução do mesmo. Daí, gostaria de prestar um sincero agradecimento aos meus orientadores, o Professor Doutor José Maria Oliveira e Mestre Isabel Araújo por toda a ajuda, apoio e disponibilidade que sempre demonstraram no decurso deste trabalho. Um sincero agradecimento por todos os ensinamentos que me transmitiram, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

À Eng.<sup>a</sup> Eugénia Vieira e ao Mestre João Drumonde Neves, um profundo agradecimento pela excelente receção e integração na empresa, pelos seus conselhos, apoio, motivação, total disponibilidade e claro, pela boa disposição e amizade.

Às empresas Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura e *Yeast Wine – Wine Solutions*, Lda., um obrigada pela oportunidade e pela confiança depositada em mim no desenvolver deste projeto. E ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, destacando a Doutora Zlatina Genisheva, agradeço o acolhimento e a disponibilização dos meios necessários para a realização parcial deste trabalho.

Por todo o incentivo no desenvolver do projeto, paciência, festejo das vitórias, ânimo e amparo nas derrotas, quero deixar o meu muito obrigada à minha mãe e à minha irmã, Patrícia. Sem vocês, hoje não conseguia estar aqui. Ao meu pai, sem ele a realização deste sonho não era possível. Apesar da sua ausência física, continuará a ser a minha fonte de motivação e inspiração. Esteja onde estiver espero que assista, repleto de orgulho, o finalizar desta etapa. Ao Nuno e ao tio Gaspar, por terem feito questão de estarem sempre presentes.

Sou igualmente, muito grata a todos os meus amigos, pelo incentivo recebido ao longo destes meses. Em especial à Carla, Maura e Tânia agradeço cada minuto que “perderam” a ouvir os meus desabafos e cada sorriso que me dedicaram.

Por fim (mas não menos importante) ao Tiago. Obrigada pelo amor, alegria e atenção sem reservas. Por estar sempre presente, pelo seu apoio, paciência, incentivo constante e sobretudo por me fazer acreditar que tudo é possível.



## Sumário

Este projeto teve como objetivo a produção de vinho à escala piloto (20 L), numa estação capaz de reproduzir as condições gerais de fermentação utilizadas em adega. Incidiu-se o estudo na apreciação de cinco estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* e também da estirpe comercial Lalvin QA23® (amostra padrão), dando ênfase ao seu comportamento fermentativo. As estirpes foram previamente selecionadas pelo seu excelente potencial enológico demonstrado anteriormente. Em simultâneo foi realizado um estudo fermentativo a microescala (50 mL).

Foi vinificado um mosto industrial dessulfitado (castas *Arinto*, *Avesso*, *Trajadura e Loureiro*) em que o processo fermentativo foi acompanhado pela monitorização da densidade e da temperatura do mosto em fermentação. Foi também verificado o consumo de glucose e frutose e a produção de etanol, entre outros produtos secundários do metabolismo. Os diferentes vinhos produzidos à escala piloto foram analisados a nível físico-químico e sensorial. Recorrendo à cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) e à tecnologia FTIR (espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier*) foi possível avaliar diferentes parâmetros, tais como os teores de açúcar, o teor em etanol e glicerol, os ácidos orgânicos, o ácido acético, a acidez total, e o pH. Os compostos voláteis do aroma foram determinados por cromatografia gasosa, GC-FID (compostos voláteis maioritários), e GC-MS (compostos voláteis minoritários). Foi também realizada uma prova organolética, contando com um painel de 10 provadores (2 femininos e 8 masculinos) não treinados. As amostras estudadas a microescala foram apenas analisadas a nível físico-químico pelos métodos HPLC e FTIR.

A análise dos compostos voláteis do aroma apresentou ligeiras diferenças nos resultados obtidos por cromatografia gasosa, essencialmente em compostos voláteis característicos do aroma secundário. Assim, comprova-se que a partir do mesmo mosto, apenas variando a estirpe de levedura utilizada durante a fermentação, é possível produzir vinhos com diferentes características aromáticas. Três das estirpes mostraram-se como boas concorrentes face à estirpe comercial Lalvin QA23®, sendo que, os vinhos produzidos pelas mesmas foram possuidores de excelentes características aromáticas, prevendo-se potencial inserção no mercado. Em contrapartida uma das estirpes foi automaticamente descartada, apresentando um defeito a nível sensorial levando a crer ter havido excesso de produção de sulfureto de hidrogénio. Os resultados obtidos nos diferentes volumes em estudo foram semelhantes, verificando-se reprodutibilidade de resultados no aumento de escala de fermentação.



## Abstract

The main objective of this project was making wine at scale-pilot (20 L), in a station capable of reproducing the general terms used in the fermentation occurring in a wine cellar. The study is focused on the evaluation of five strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and also the commercial yeast Lalvin QA23<sup>®</sup> emphasizing its fermentative behavior. The strains were previously selected for its excellent oenological potential demonstrated. Simultaneously one study fermentative micro-scale (50 mL) was performed.

An industrial must (castes *Arinto*, *Avesso*, *Trajadura* and *Loureiro*) was used in the fermentation process. It was followed by monitoring the density and temperature of the fermenting must. It was also verified the consumption of glucose and fructose and ethanol production, among other products of metabolism. Different wines produced at scale-pilot were analyzed at chemical and sensory level. Using the high performance liquid chromatography (HPLC) and FTIR (infrared spectroscopy with *Fourier* transform) technology, it was possible to evaluate various parameters such as sugars and ethanol content, organic acids, total acidity and pH. The aroma compounds were determined by gas chromatography, GC-FID (majority volatile compounds) and GC-MS (minor volatile components) technologies. It was also done an organoleptic test, with a panel of 10 tasters (8 male and 2 female) untrained. The micro-scale samples were only analyzed at the chemical level by HPLC and FTIR methods.

Analysis of aroma compounds showed slight differences in the results obtained by gas chromatography, mainly in the compounds, characteristic of secondary aroma. Thus, it proves that from the same must, only varying the strain of yeast used during fermentation, it is possible to produce wines with different flavor characteristics. Three of the strains proved to be good competitors compared to commercial strain QA23<sup>®</sup> Lalvin, since the wines produced by these strains shown excellent aromatic characteristics. In contrast one of those was discarded automatically because of presence of a sensory deficiency characteristic, due to a possible excessive production of hydrogen sulfide. Chemical analysis showed no notable variances, leading to their independence from the strain under study. The results obtained in different volumes under study were similar, verifying reproducibility of results in increased scale fermentation.



# Índice

<b>Declaração.....</b>	<b>i</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>iii</b>
<b>Sumário.....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice .....</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>xv</b>
<b>Lista Símbolos e de Abreviaturas .....</b>	<b>xvii</b>
Siglas .....	xvii
Variáveis e constantes .....	xvii
Expressões do latim .....	xviii
<b>I - Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Enquadramento geral .....</b>	<b>3</b>
1.1 Objetivos e motivações .....	3
1.2 A Empresa .....	4
1.3 Estrutura da tese .....	4
<b>2. O Vinho .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Portugal e a Vinicultura .....</b>	<b>7</b>
<b>4. Denominação de Origem .....</b>	<b>8</b>
4.1 Região Demarcada dos <i>Vinhos Verdes</i> .....	8
4.1.1 Os <i>Vinhos Verdes</i> , brancos .....	10
Castas brancas recomendadas para vinificação dos <i>Vinhos Verdes</i> .....	11
<b>5. Tecnologia de vinificação .....</b>	<b>15</b>
5.1 Fermentação alcoólica.....	15
Influência da temperatura.....	17
<b>6. Compostos odoríferos das uvas e dos vinhos .....</b>	<b>19</b>
6.1 Classificação do aroma do vinho .....	20
Aroma primário .....	20
Aroma secundário .....	21
Aroma terciário.....	23
<b>7. Papel das leveduras no aroma do vinho .....</b>	<b>24</b>
7.1 Estirpes vínicas.....	24

<i>Saccharomyces</i> vs não- <i>Saccharomyces</i> .....	24
7.2 Leveduras secas ativas.....	25
Estirpe comercial de <i>S. cerevisiae</i> (Lalvin QA23®) .....	27
<b>8. Análise sensorial.....</b>	<b>29</b>
<b>9. Metodologias HPLC e FTIR.....</b>	<b>31</b>
<b>II – Materiais e Métodos .....</b>	<b>31</b>
<b>10. Planeamento Experimental .....</b>	<b>33</b>
10.1 Estação piloto .....	33
10.2 Caracterização do mosto .....	34
<b>11. Inoculação das estirpes de <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>12. Fermentação alcoólica .....</b>	<b>36</b>
12.1 Fermentação à escala piloto.....	36
12.2 Fermentação em microescala.....	37
<b>13. Caracterização dos mostos em fermentação e dos vinhos .....</b>	<b>39</b>
13.1 Ácidos orgânicos, açúcares, glicerol, etanol, ácido acético, acidez total e pH.....	39
13.2 Compostos voláteis maioritários .....	40
13.3 Compostos voláteis minoritários.....	41
<b>14. Prova organolética.....</b>	<b>43</b>
<b>III – Resultados e Discussão .....</b>	<b>45</b>
<b>15. Caracterização dos vinhos – escala piloto .....</b>	<b>47</b>
15.1 Monitorização da FA.....	47
15.2 Análise química.....	50
15.2.1 Açúcares, ácidos orgânicos, glicerol, etanol e ácido acético .....	50
15.2.2 Compostos voláteis do aroma - maioritários .....	58
15.2.3 Compostos voláteis do aroma - minoritários .....	62
15.3 Análise sensorial .....	67
Exame visual .....	67
Exame olfativo .....	68
Exame gustativo.....	70
Apreciação global .....	72
<b>16. Caracterização dos vinhos – microescala .....</b>	<b>73</b>
16.1 Monitorização da FA.....	73
16.2 Análise química.....	75
16.2.1 Açúcares, ácidos orgânicos, glicerol, etanol, ácido acético, acidez total e pH	
.....	75
<b>IV – Conclusões e Perspetivas de Trabalho .....</b>	<b>79</b>

<b>17. Principais conclusões .....</b>	<b>81</b>
<b>18. Perspetivas de trabalho.....</b>	<b>83</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>85</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>95</b>
ANEXO A: Doseamento de SO <sub>2</sub> (antes do engarrafamento) .....	97
ANEXO B: Ficha de prova .....	98
ANEXO C: Monitorização à escala piloto .....	99
ANEXO D: Retas de calibração – HPLC.....	100



## Índice de Figuras

FIGURA I.1. DOMINAÇÕES DE ORIGEM EM PORTUGAL .....	9
FIGURA I.2. CASTAS: 1- ARINTO, 2- AVESSO, 3- LOUREIRO, 4- TRAJADURA .....	12
FIGURA I.3. ESQUEMA DA UVA AO PRODUTO FINAL UTILIZANDO LSA, (ADAPTADO DE BORNEMAN <i>ET AL.</i> , 2007) .....	26
FIGURA II.1. ESTAÇÃO PILOTO - <i>YEAST WINE - WINE SOLUTIONS</i> , LDA .....	33
FIGURA II.2. FERMENTAÇÃO EM MICROESCALA (MICROFERMENTAÇÕES) A-VÁLVULA DE <i>MÜLLER</i> , B, C e D-ASPETO GERAL .....	37
FIGURA II.3. METODOLOGIA FTIR- <i>OENOFOSST</i> <sup>TM</sup> .....	40
FIGURA II.4. SALA DE PROVA .....	43
FIGURA III.1. CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES (GLUCOSE + FRUTOSE, <i>G+F</i> ) E FORMAÇÃO DE ETANOL (C) AO LONGO DO TEMPO (t) - ESTIRPE S .....	49
FIGURA III.2. CONTRIBUIÇÃO DE CADA GRUPO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS MINORITÁRIOS ENCONTRADOS NOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO .....	66
FIGURA III.3. APRESENTAÇÃO DOS VINHOS DURANTE O EXAME ORGANOLÉTICO, 1- LALVIN QA23 <sup>®</sup> , 2-CM, 3-S, 4-F, 5-M, 6-BE .....	68
FIGURA III.4. PERFIL SENSORIAL DOS VINHOS PRODUZIDOS (A- CASO 1 e B- CASO 2) .....	69
FIGURA III.5. ESTIRPE S - ENSAIO EM MICROESCALA (A-TURBIDEZ, B e C-"DEPÓSITO" FORMADO).....	74
FIGURA B.1. FICHA DE PROVA.....	98
FIGURA C.1. MONITORIZAÇÃO DA FA À ESCALA PILOTO: 1-BE, 2-M, 3-F, 4-S, 5-CM, 6-LALVIN QA23 <sup>®</sup> .....	99



## Índice de Tabelas

TABELA II.1 CONCENTRAÇÃO (C) DE HEXOSES E ÁCIDOS ORGÂNICOS, E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO ( $p=0,05$ ).....	34
TABELA II.2 CORRELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO CELULAR (N) E VOLUME DE SUSPENSÃO CELULAR (V) DE CADA ESTIRPE, INOCULADO EM 20 L DE MOSTO .....	35
TABELA III.1 VALORES DE DENSIDADE (D) E RESPECTIVO TEMPO (t) DE FA (CASO 1 E CASO 2) – ESCALA PILOTO .....	50
TABELA III.2 CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE ( $C_{GLUC}$ ) E DE FRUTOSE ( $C_{FRUT}$ ), DETERMINADOS POR HPLC, NOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO, E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO ( $p=0,05$ ).....	51
TABELA III.3 CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL ( $C_{GLICEROL}$ ) E ETANOL (TAV) DETERMINADOS POR HPLC, NOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO, E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO ( $p=0,05$ ).....	52
TABELA III.4 CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO TARTÁRICO ( $C_{TART}$ ), ÁCIDO MÁLICO ( $C_{MÁL}$ ) E ÁCIDO CÍTRICO ( $C_{CÍTRICO}$ ) DETERMINADOS POR HPLC, NOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO, E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO ( $p=0,05$ ).....	54
TABELA III.5 CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ACÉTICO ( $C_{ACÉTICO}$ ) DETERMINADOS POR HPLC, NOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO, E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO ( $p=0,05$ ).....	56
TABELA III.6 CONCENTRAÇÕES DE ACIDEZ TOTAL (AT) E VALORES DE PH DETERMINADOS POR FTIR, NOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO, E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO ( $p=0,05$ ).....	57
TABELA III.7 CONCENTRAÇÕES (C) DE ACETALDEÍDO, ACETATO DE ETILO, METANOL E ÁLCOOIS SUPERIORES DETERMINADOS POR GC-FID, NOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO (CASO 1), E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO ( $p=0,05$ ).....	59
TABELA III.8 CONCENTRAÇÕES (C) DE ACETALDEÍDO, ACETATO DE ETILO, METANOL E ÁLCOOIS SUPERIORES DETERMINADOS POR GC-FID, NOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO (CASO 2), E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO ( $p=0,05$ ).....	59
TABELA III.9 LIMIAR DE PERCEÇÃO OLFATIVO (LPO) E VALORES DE ATIVIDADE OLFATIVA (VAO) PARA OS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO – CASO 2.....	61
TABELA III.10 CONCENTRAÇÃO (C) E LIMIAR DE PERCEÇÃO OLFATIVA (LPO) DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS MINORITÁRIOS DO AROMA, NOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO – CASO 2.....	63

TABELA III.10 CONCENTRAÇÃO (C) E LIMIAR DE PERCEÇÃO OLFATIVA (LPO) DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS MINORITÁRIOS DO AROMA, NOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO – CASO 2 (CONTINUAÇÃO) .....	64
TABELA III.11 EXAME VISUAL DOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO.....	67
TABELA III.12 EXAME GUSTATIVO DOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO .....	71
TABELA III.13 EXAME GUSTATIVO DOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO (2).....	71
TABELA III.14 APRECIÇÃO GLOBAL DOS VINHOS PRODUZIDOS À ESCALA PILOTO, (MEDIANA DAS CLASSIFICAÇÕES ATRIBUÍDAS) .....	72
TABELA III.15 DURAÇÃO (t) DA FA EM MICROESCALA TENDO EM CONTA AS TRÊS RÉPLICAS EM ESTUDO (1, 2 e 3).....	74
TABELA III.16 CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE (C <sub>GLUC</sub> ), FRUTOSE (C <sub>FRUT</sub> ), GLICEROL (C <sub>GLICEROL</sub> ) E ETANOL (TAV) DETERMINADOS POR HPLC, NOS VINHOS PRODUZIDOS EM MICROESCALA, E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO (p=0,05).....	75
TABELA III.17 CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO TARTÁRICO (C <sub>TART</sub> ), ÁCIDO MÁLICO (C <sub>MÁL</sub> ) E ÁCIDO CÍTRICO (C <sub>CÍTRICO</sub> ) DETERMINADAS POR HPLC, NOS VINHOS PRODUZIDOS EM MICROESCALA, E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO (p=0,05).....	77
TABELA III.18 CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ACÉTICO (C <sub>ACÉTICO</sub> ) DETERMINADO POR HPLC, ACIDEZ TOTAL (AT) E PH DETERMINADO POR FTIR – VINHOS PRODUZIDOS EM MICROESCALA, E RESPECTIVO ERRO ASSOCIADO (p=0,05).....	77
TABELA A.1: CONCENTRAÇÃO (C) DE SO <sub>2</sub> LIVRE E COMBINADO .....	97
TABELA D.1: CONCENTRAÇÃO MÁXIMA (C) DOS VÁRIOS COMPOSTOS UTILIZADOS PARA CALIBRAÇÃO .....	100
TABELA D.2: EQUAÇÕES DAS RETAS DE CALIBRAÇÃO PARA CADA COMPOSTO E RESPECTIVO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R <sup>2</sup> ).....	100

## Lista Símbolos e de Abreviaturas

### Siglas

<b>CVRV</b>	Comissão de Viticultura da Região dos <i>Vinhos Verdes</i>
<b>DO</b>	Denominação de Origem
<b>FA</b>	Fermentação alcoólica
<b>FID</b>	Detetor de Ionização de Chama, do inglês <i>Flame Ionization Detetor</i>
<b>FML</b>	Fermentação malolática
<b>FTIR</b>	Espectroscopia por Infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i>
<b>GC</b>	Cromatografia Gasosa
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de elevada eficiência
<b>IVV</b>	Instituto da Vinha e do Vinho, I.P.
<b>LSA</b>	Leveduras secas ativas
<b>MS</b>	Espectrometria de Massa, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
<b>OIV</b>	Organização internacional da Vinha e do Vinho, do inglês <i>International Organization of Vine and Wine</i>
<b>YPD</b>	Extrato de Levedura Peptona Dextrose, do inglês <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
<b>UE</b>	União Europeia

### Variáveis e constantes

<b>A</b>	Área
<b>AT</b>	Acidez total
<b>C</b>	Concentração
<b>D</b>	Densidade
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>F</b>	Frequência
<b>FCR</b>	Força centrífuga relativa

<b>G + F</b>	Glucose + Frutose
<b>MG</b>	Média Geométrica
<b>I</b>	Intensidade
<b>LPO</b>	Limiar de Percepção Olfativa
<b>VAO</b>	Valor de Atividade Olfativo
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de correlação
<b>t</b>	Tempo
<b>TAV</b>	Título Alcoométrico Volúmico

### Expressões do latim

<b>e.g.</b>	Por exemplo, do latim <i>Exempli gratia</i>
<b>et al</b>	E outros, do latim <i>et alli</i>
<b>i.e.</b>	Isto é, do latim <i>id est</i>

# I - Introdução



## 1. Enquadramento geral

### 1.1 Objetivos e motivações

A Vinalia é uma empresa que oferece soluções biotecnológicas aplicadas à vitivinicultura. Ao longo de vários anos, a empresa recolheu e estudou diferentes estirpes autóctones com perspetivas enológicas, de várias regiões vinícolas de Portugal. Assim, atualmente a empresa possui uma coleção de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em diversos ambientes vitivinícolas de todo o país. Desta coleção, e após identificação e caracterização fenotípica, foram selecionadas várias estirpes que apresentaram características enológicas interessantes. Após diferentes testes de microvinificação foram selecionadas 15 estirpes de *S. cerevisiae* autóctones de diferentes regiões vinícolas de Portugal, que se mostraram mais adaptadas à fermentação alcoólica e por isso com maior potencial enológico.

O trabalho incidiu no estudo de cinco das estirpes de *S. cerevisiae* previamente selecionadas pelo seu excelente potencial enológico demonstrado anteriormente. Pretendeu-se com este projeto, testar as leveduras selecionadas em fermentações à escala piloto (20 L), numa estação capaz de reproduzir as condições gerais de fermentação utilizadas em adega. Paralelamente, foi realizado um estudo fermentativo em microescala (50 mL), permitindo a análise físico-química comparativa tendo em conta as diferentes escalas laborais.

O mosto utilizado no ensaio consistiu num mosto dessulfitado, e numa mistura de quatro castas, *Arinto*, *Avesso*, *Loureiro* e *Trajadura*. Estas castas encontram-se listadas como castas recomendadas para a produção de vinhos da Região *Vinhos Verdes*, (Portaria n.º 668/2010, de 11 de Agosto).

As amostras finais obtidas, em ambas as escalas em estudo, foram analisadas a nível físico-químico. Recorrendo à cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) e à tecnologia FTIR (espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier*), foi possível avaliar diferentes parâmetros, tais como os teores de açúcar, o teor em etanol e glicerol, os ácidos orgânicos, o ácido acético, o pH, e a acidez total. Tendo em conta os vinhos produzidos à escala piloto, investigou-se também a existência de compostos odoríferos pelas tecnologias GC-FID (compostos voláteis maioritários) e GC-MS

(compostos voláteis minoritários). No que diz respeito à análise sensorial, foi realizada uma prova organoléptica.

## 1.2 A Empresa

A Vinalia – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura, é *Spin-off* académico da Universidade do Minho. Segundo a página WEB da empresa a sua ligação à Universidade do Minho, através do seu estatuto de *Spin-Off* representa:

- Interlocação direta com projetos de investigação personalizados e dirigidos ao cliente;
- Apoio de mentores científicos - Professores e investigadores da UM; e
- Disponibilização de *know-how* científico e tecnológico.

No que diz respeito aos serviços prestados pela empresa em causa, devem destacar-se, a otimização da qualidade das uvas antes da vindima, a condução analítica de vinificação, a estabilização e a conservação de vinhos. Enfatiza-se igualmente a sua capacidade para determinações analíticas, a nível físico-químico e microbiológico, bem como a sua capacidade para organização de análises sensoriais.

## 1.3 Estrutura da tese

Esta dissertação está dividida em quatro partes.

A primeira parte, (I) introdução, visa enquadrar o leitor no trabalho apresentado, procurando justificar a necessidade do estudo efetuado e referindo os principais objetivos implícitos à sua realização. Inicia-se dando alguma ênfase à Região Demarcada dos *Vinhos Verdes* onde se procura apresentar, de uma forma sucinta, as suas particularidades como região produtora de vinhos com Denominação de Origem (DO), destacando as quatro castas presentes no mosto utilizado. Por fim é feita uma revisão bibliográfica sobre o tema principal do trabalho, a tecnologia de vinificação em branco, enfatizando o efeito da temperatura; os compostos odoríferos das uvas e dos vinhos, onde se refere a classificação dos compostos do aroma dos vinhos; o papel das leveduras no aroma do vinho, dando ênfase às leveduras secas ativas (LSA); e uma breve descrição das metodologias de trabalho HPLC e FTIR.

Na segunda parte (II) são apresentados os materiais e metodologias subjacentes à realização do trabalho. É descrita a estação piloto utilizada para a realização deste projeto, bem como, uma breve caracterização do mosto utilizado. Descrevem-se também os métodos utilizados (em ambas as escalas em estudo), na sua monitorização da fermentação alcoólica; as tecnologias empregues na análise dos açúcares, do título alcoométrico volúmico (*TAV*) e dos ácidos orgânicos nos vinhos produzidos. Faz-se ainda referência às técnicas usadas para identificar e quantificar os compostos do aroma, assim como, à metodologia estabelecida para a análise sensorial dos vinhos. Estes dois últimos estudos foram realizados apenas para os vinhos produzidos à maior escala.

A parte III é constituída pelos resultados obtidos e pela discussão dos mesmos. Por questões organizativas, entendeu-se dividir esta parte em dois capítulos. O primeiro capítulo corresponde à caracterização dos vinhos produzido à escala piloto, onde se pode encontrar duas vertentes diferentes em estudo. Uma vez que o estudo fermentativo de cada estirpe foi realizado em duplicado optou-se, na fase final, pela interrupção forçada da fermentação de uma das estirpes, deixando o duplicado terminar a fermentação até valor de densidade constante. Neste primeiro capítulo é também descrito o comportamento fermentativo das diferentes estirpes em estudo; a análise físico-química geral dos vinhos produzidos e a caracterização aromática (compostos do aroma maioritários e minoritários); são também apresentados e discutidos os resultados da prova organolética. O segundo capítulo diz respeito à caracterização dos vinhos produzidos em microescala, onde é também descrito o comportamento fermentativo de cada estirpe e a análise físico-química geral dos vinhos produzidos.

A quarta e última parte (IV) é constituída pelas conclusões mais importantes e por algumas sugestões visando futuros trabalhos.

## 2. O Vinho

As antigas civilizações elegeram deuses como os doadores do vinho: Dionísio na Grécia, Osíris no Egito e Baco em Roma, outros partilham a opinião de que o vinho nasceu no Oriente. Facto é que o momento e a localidade em que o homem bebeu o primeiro trago de vinho continuam uma incerteza. De qualquer modo, sabe-se que a vinha espontânea (*Vitis vinifera sylvestris*) existe há mais de um milhão de anos (Amaral, 1994).

Nos dias que correm, o cultivo da vinha está desenvolvido em todo o mundo. A vinha cultivada, de espécie *Vitis vinifera sativa*, adapta-se bem em diferentes climas e solos, sendo no entanto favorecida pelo clima moderado. Existem várias espécies distribuídas pelo mundo – são conhecidas cerca de 8 000 subespécies (Amaral, 1994).

Segundo o Regulamento (CE) n.º 491/2009, de 25 de Maio, vinho é definido como sendo um produto obtido exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mostos de uvas. Sumo de uva, mais formalmente conhecido por mosto, é um produto líquido obtido por processos físicos a partir de uvas frescas fermentescíveis, originando espontaneamente uma fermentação alcoólica. O mosto pode encontrar-se, visando o seu fim para estudos tecnológicos, sob a forma de amuado ou concentrado. Segundo, o Regulamento (UE) n.º 296/2012, de 27 de Julho, define-se mosto amuado como sendo aquele cuja fermentação foi temporariamente impedida por qualquer processo, químico ou físico, permitido por lei, enquanto o mosto concentrado é produto da desidratação parcial do mosto.

### 3. Portugal e a Vinicultura

No que concerne a Portugal, não se sabe precisar quando é que o vinho surgiu, supondo-se que as primeiras vinhas tenham sido cultivadas pelos tartéssios (cerca 2 000 a.C.) nos vales do Tejo e Sado. Mais tarde (por volta dos séculos VI e VII), com a expansão do Cristianismo o vinho torna-se indispensável para o ato sagrado da comunhão. Os documentos canónicos da época evidenciam a "obrigatoriedade" da utilização do vinho genuíno da videira na celebração da missa (Amaral, 1994).

Durante vários séculos a vinicultura portuguesa atravessou uma fase de grande desenvolvimento, ganhando popularidade. Atualmente, o vinho português tem conseguido afirmar-se a nível internacional devido à diversidade e singularidade das suas castas, a que se associa uma qualidade muito consistente e uma excelente relação qualidade-preço.

Os vinhos portugueses são muito fáceis de agradar ao consumidor. A grande experiência adquirida ao longo do tempo, aliada ao facto da tecnologia industrial ter evoluído muito nos últimos anos, fez o vinho português progredir muito e ser reconhecido no mercado com um dos melhores do mundo. Atualmente a sua reputação internacional é inquestionável. No ano 2011, Portugal encontrava-se bem posicionado, no que diz respeito à produção vinícola, em 11.º a nível mundial e em 5.º a nível europeu.<sup>1</sup> As exportações de vinho português, para todo o mundo, demonstram também o seu dinamismo do setor vitivinícola.

---

<sup>1</sup> *International Organisation of Vine and Wine – StatOIV Extracts 2013*, consultado a 20 de Setembro 2014

## 4. Denominação de Origem

Com o desenvolvimento da vinicultura, surgiu a necessidade de proteger a genuinidade cultural e a qualidade do vinho, *i.e.*, controlar as denominações de origem com o objetivo de reduzir a probabilidade de, vinhos de qualidade inferior serem classificados como vinhos de alta qualidade.

Este conceito é aplicável a produtos, neste caso o vinho, cuja originalidade e individualidade estão ligados de forma indissociável a uma determinada região, local ou denominação tradicional. Para beneficiar de uma Denominação de Origem (DO), todo o processo de vinificação é sujeito a um controlo rigoroso em todas as suas fases, desde a vinha até ao consumidor. As castas utilizadas, natureza do solo, rendimento por hectare, os métodos de vinificação, as características físico-químicas e organoléticas são apenas alguns dos fatores dos quais a sua nomeação está dependente. A sua atribuição e controlo cabe a uma Entidade Certificadora, neste caso às Comissões Vitivinícolas Regionais (Decreto-Lei n.º 212/04, de 23 de Agosto).

O solo e clima de Portugal, assim como as diferentes castas de cada região permitiram, desde há muito tempo, a produção de vinhos de alta qualidade e tipicidade. Por este motivo, Portugal foi o primeiro país do mundo vitícola, a estabelecer e a regulamentar uma região demarcada, a do Douro, por alvará régio em 1756 (Pereira, 2008). Algumas outras regiões de vinho com qualidade e características autênticas, como Bucelas, Carcavelos, Colares, Dão, Madeira, Setúbal e *Vinhos Verdes*, foram reconhecidas oficialmente em 1907 e, em 1908, com a demarcação de suas respectivas áreas geográficas. Atualmente existem 29 regiões no país, com direito ao título DO (Figura I.1).

### 4.1 Região Demarcada dos *Vinhos Verdes*

A informação seguidamente apresentada é, essencialmente, baseada na página WEB da Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV).

Em 18 de Setembro de 1908 a região é delimitada pela primeira vez, através de uma Carta de Lei, onde são definidas também algumas características do Vinho Verde bem como as formas de cultura. Como tal, a Região dos Vinhos Verdes comemorou em 2008 o centenário da sua demarcação.

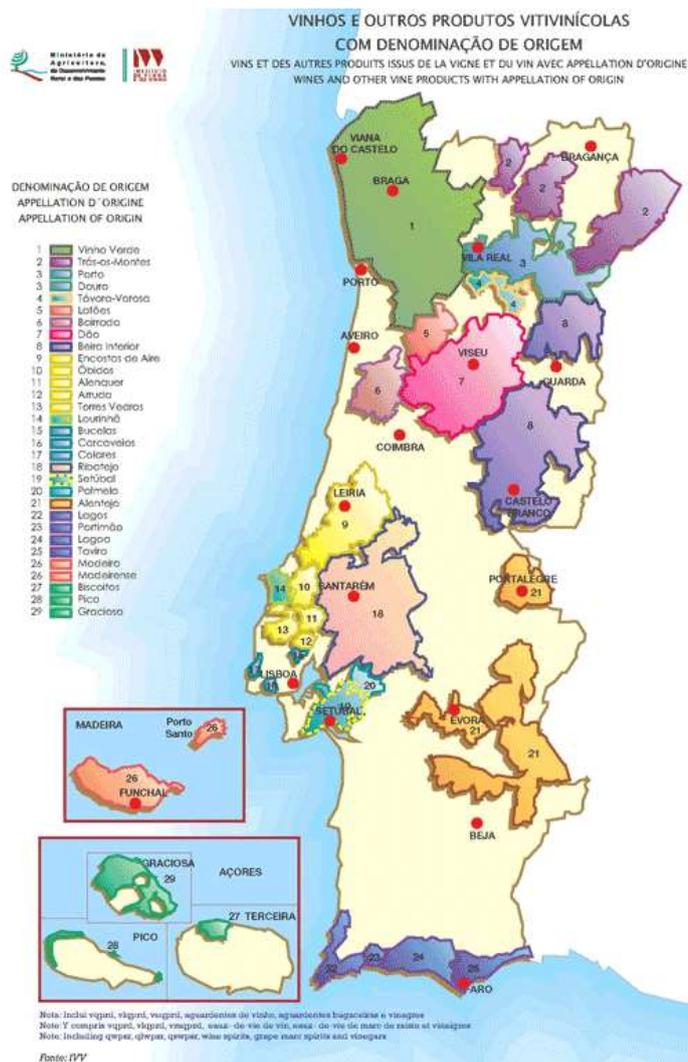


Figura I.1 - Dominações de Origem em Portugal.

A região dos *Vinhos Verdes* estende-se por todo o noroeste do país, tradicionalmente conhecida como Entre Douro e Minho. Tem como limites a norte o rio Minho (fronteira com a Galiza) e a sul o rio Douro e as serras da Freita, Arada e Montemuro, a oeste o oceano Atlântico e a este as serras da Peneda, Gerês, Cabreira e Marão.

As vinhas caracterizam pela sua grande expansão vegetativa, com distintas formas de condução. Ocupam uma área de 21 mil hectares e correspondem a 15 % da área vitícola nacional. Questões de ordem cultural, microclimas, tipos de vinho, encepamentos e modos de condução das vinhas levaram à divisão da Região Demarcada dos *Vinhos Verdes* em nove subregiões (Amarante, Ave, Baião, Basto, Cávado, Lima, Monção e Melgaço, Paiva, Sousa).

Esta região é caracterizada por um clima ameno quanto a temperaturas e amplitudes térmicas, e rico em pluviosidade. O aspeto mais marcante no clima é o regime anual de chuvas, que se caracteriza por totais anuais bastante elevados (em média 1 500 mm<sup>3</sup>/mm<sup>2</sup>) e uma distribuição irregular ao longo do ano concentrada no Inverno e na Primavera. Isto é, as temperaturas mais altas coincidem, durante o ano, com as precipitações mais baixas - final da Primavera e Verão quentes e secos - e as temperaturas mais baixas com as precipitações mais altas - Invernos frios e chuvosos.

O relevo, apresenta-se com uma topografia bastante irregular, sendo recortada por uma densa rede de vales associada à rede fluvial, aspeto que se acentua do litoral para o interior. Em relação ao solo, tem, na maior parte da região, origem na desagregação do granito. Caracteriza-se, regra geral, por apresentar pouca profundidade, texturas predominantemente arenosas a franco-arenosas (ligeiras), acidez naturalmente elevada e pobreza em fósforo.

Os níveis de fertilidade são naturalmente baixos. No entanto, dada a natureza dos sistemas agrários praticados desde tempos recuados na região, os solos apresentam uma fertilidade adquirida considerável, que permitiu durante séculos suportar as mais altas densidades populacionais do país. O segredo desta fertilidade pode resumir-se a dois principais tipos de intervenções do homem nas condições naturais: o controlo do relevo pela construção de socalcos e as incorporações intensivas e persistentes de matéria orgânica no solo.

### 4.1.1 Os *Vinhos Verdes*, brancos

O *Vinho Verde* branco é naturalmente leve e fresco, produzido na Região Demarcada dos *Vinhos Verdes*, no noroeste de Portugal. Uma região costeira geograficamente bem localizada para a produção de excelentes vinhos brancos.

Como características organoléticas, os *Vinhos Verdes* apresentam cor entre citrino descorado e ligeiramente dourado. A intensidade da cor deriva das castas, do clima e do método de vinificação. O seu aroma é frutado, delicado e de intensidade mediana a forte. O aroma frutado prende-se a frutos frescos, como banana, maçã e pera. Em alguns casos distinguem-se certas notas florais a rosas e a madressilva. Na boca são leves, frescos,

---

ligeiramente ácidos, normalmente secos, podendo no entanto ser adamado, meio doces ou doces. O carácter frutado também se destaca no sabor, podendo ser progressivamente dominado por um final de boca onde aparece o melado, mais ou menos seco, com alguns reflexos de frutos secos (amêndoa), no caso de vinhos com um ou mais anos.

Uma das características do *Vinho Verde* é a "agulha", ou seja, um ligeiro desprendimento gasoso devido ao anidrido carbónico presente. Medianamente alcoólico, devido à sua frescura, é um vinho muito apetecido sobretudo na época quente.

### Castas brancas recomendadas para vinificação dos *Vinhos Verdes*

Designa-se por casta ou variedade de videira como um conjunto de clones idênticos, mas que apresentam entre si diferenças agronómicas ou qualitativas mais ou menos importantes (Martins, 2004). As suas características morfológicas e qualidades particulares transmitem ao vinho um carácter único, constituindo assim uma variedade singular com componentes organoléticas específicas. Não se pode mencionar castas de videiras, sem fazer a sua associação ao *terroir* (agregado de características transmitidas pelo solo e pelo clima às videiras), pois conforme o local onde se encontra plantada, uma mesma casta reage de forma diferente originando diferenças no produto final, o vinho.

No que diz respeito a Portugal, foi elaborada a Lista das Castas Aptas à Produção de Vinho preceituada na Portaria n.º 380/2012, de 22 Novembro. Nesta perspetiva, cada casta é identificada por um nome principal e, quando justificável por tradições expressivas, por um sinónimo reconhecido, com uma utilização que se pretende equivalente.

A tipicidade e a originalidade dos *Vinhos Verdes* é o resultado, por um lado, das características do solo, clima e fatores socioeconómicos da Região dos *Vinhos Verdes*, e, por outro, das peculiaridades das castas autóctones da região e das formas de cultivo da vinha.

A mais recente legislação acerca das castas em cultura nesta Região é a Portaria n.º 668/2010, de 11 de Agosto, que as define como aptas a produzirem vinhos com Denominação de Origem *Vinho Verde*. São enumeradas 23 castas para a produção de vinho branco e 22 para a produção de tinto.

Castas recomendadas são aquelas que pelo seu potencial biológico e tecnológico contribuem decisivamente para a obtenção de vinhos de alta qualidade e marcada tipicidade desde que exploradas racionalmente e em condições ecológicas que lhes sejam propícias (Oliveira e Pinho, 1993). As castas brancas recomendadas para a produção de vinho com DO *Vinho Verde* são: *Alvarinho*, *Arinto*, *Avesso*, *Azal*, *Batoca*, *Loureiro* e *Trajadura*.

Por outro lado, na Portaria n.º 159/2014, de 19 de Agosto, estão definidas as castas a utilizar na elaboração dos produtos com direito à Indicação Geográfica “Minho”.

O mosto utilizado neste trabalho consistiu numa mistura de quatro castas brancas recomendadas, especificamente: *Loureiro*, *Arinto*, *Avesso* e *Trajadura* (Figura I.2). Como tal segue-se uma breve descrição das castas em causa, tendo como base bibliográfica a página WEB do IVV, Instituto da Vinha e do Vinho I.P., e página WEB da CVRVV.



Figura I.2 - Castas - 1- *Arinto*, 2- *Avesso*, 3- *Loureiro*, 4- *Trajadura*.

**Arinto**

A casta *Arinto* é bastante versátil e por isso muito cultivada em quase todas as regiões vinícolas; contudo, é originária da região de Bucelas. É uma casta muito vigorosa, de porte ereto, e que assume uma forma geral grande expressão vegetativa, em função da fertilidade do terreno, do porta-enxerto e da nutrição. Adapta-se com facilidade a todos os terrenos, manifestando alguma exigência em humidade. O seu cacho é grande, compacto e de pedúnculo de comprimento médio.

Produz mostos ácidos, apresentando valores muito elevados em ácidos orgânicos (acidez total, expressa em ácido tartárico, 6 g L<sup>-1</sup> a 12 g L<sup>-1</sup>) e com satisfatória riqueza em açúcar - álcool provável de 11 % vol. a 12,5 % vol. Com grande valor do ponto de vista enológico, dá origem a vinhos de cor citrina a citrina-palha. Os vinhos evidenciam características aromáticas particulares sendo muito finos e medianamente intensos; quanto ao sabor são frescos, vivos e persistentes.

**Avesso**

A casta *Avesso* é cultivada na região dos *Vinhos Verdes*; contudo, a sua plantação concentra-se próxima da região do Douro, especificamente nas sub regiões de Baião, Resende e Cinfães. Nestas regiões esta casta encontra as condições favoráveis para se desenvolver, uma vez que prefere solos mais secos e menos férteis do que aqueles que habitualmente existem em outras zonas da região dos *Vinhos Verdes*. Os cachos da casta *Avesso* são de tamanho médio e os seus bagos são grandes e verde-amarelados. Esta casta origina vinhos aromáticos, bastante saborosos e harmoniosos. Dá origem a vinhos de cor intensa, palha aberta, com reflexos esverdeados, aroma misto entre o frutado (laranja e pêsego), o amendoado (frutos secos) e o floral, sendo o carácter frutado dominante, delicado, fino, subtil e complexo. O sabor é frutado, ligeiramente ácido, fresco, harmonioso, encorpado e persistente. Estas potencialidades de aroma e sabor revelam-se somente alguns meses após a vinificação.

**Loureiro**

A casta *Loureiro* existe em quase toda a região dos *Vinhos Verdes*. No entanto, é oriunda do vale do rio Lima. Os cachos são médios, medianamente compactos e

pedúnculo de comprimento médio, enquanto os bagos são arredondados médios de cor verde-amarelada. Origina vinhos ácidos, com aroma acentuado e característico da casta e de cor citrina. O aroma geralmente varia entre o frutado de citrinos (limão) ao floral (rosa), e sabor frutado, fresco, encorpado e persistente. Com esta casta podem ser elaborados vinhos varietais, mas é mais comum ser usada em conjunto com outras castas da região.

### ***Trajadura***

A casta *Trajadura* é oriunda da região dos *Vinhos Verdes*, particularmente da sub-região de Monção. No entanto, é também cultivada na Galiza (Espanha) com o nome de “*Treixadura*”. Os seus cachos são compactos, de tamanho médio e pedúnculo curto, compostos por bagos verde-amarelados de médias a grandes dimensões. Os vinhos produzidos com a casta *Trajadura* são pouco ácidos, de cor palha-dourada e apresentam aroma delicado mas pouco intenso. O aroma característico a frutos de árvore maduros (maçã, pera e pêsego) macerados. Não tendo grande potencial para vinhos elementares, é normalmente lotada com *Loureiro*, *Alvarinho* e *Arinto*, originando vinhos que devem ser bebidos jovens.

---

## 5. Tecnologia de vinificação

Algumas das importantes características do vinho começam a ser definidas no momento em que se colhe a uva. Por isso, torna-se muito importante determinar data da vindima com a maior exatidão possível. Esta deve ser determinada tendo em conta vários fatores, entre os quais se salienta o grau alcoólico, tendo por base o teor de açúcares, e a acidez total. Cada casta tem o seu ponto de equilíbrio e mesmo cada produtor pode determinar qual a relação que mais lhe interessa.

Quando a vindima começa, devem assegurar-se as melhores condições de transporte das uvas para a adega, e fazer-se os possíveis para que as uvas cheguem inteiras e não amassadas ou calcadas, uma vez que tal pode desencadear o início precoce de fermentação.

O método de vinificação usado nos vinhos brancos consiste em fazer fermentar o mosto depois de prensadas as uvas e, portanto, sem a presença de outros elementos que compõem o cacho; enquanto os vinhos tintos fermentam nos lagares, depois de triturada a uva. A vinificação em branco é conduzida com o fim de evitar a dissolução, direta ou enzimática, dos componentes do bagaço. Pode então considerar-se que a vinificação em branco é constituída por diferentes etapas fundamentais, a receção das uvas, a extração do mosto, a clarificação, a fermentação alcoólica (FA), a fermentação malolática (FML) quando desejável, a conservação e o envelhecimento.

De seguida é descrita, de forma sucinta, apenas a etapa da fermentação alcoólica, sendo que foi a única acompanhada e monitorizada para a realização deste projeto. Destaca-se também a influência da temperatura nesta mesma etapa, uma vez que se considera que foi o fator que poderá ter influenciado de forma mais direta os resultados obtidos.

### 5.1 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica consiste na transformação dos açúcares (glucose e frutose, principalmente) em etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), como produtos principais, além de pequenas quantidades de um grande número de produtos secundários. Este processo é desencadeado por leveduras (principalmente da espécie

*S. cerevisiae*) que existem nas películas das uvas. No entanto, industrialmente é usual recorrer à sua adição para que o processo se inicie mais rapidamente.

Esta etapa de vinificação pode ser dividida em quatro fases, a fase de latência, a fase exponencial de crescimento, a fase estacionária e o declínio (morte das leveduras). Estas fases estão relacionadas com o crescimento microbiano e são dependentes da temperatura de fermentação.

A fase de latência, geralmente ocorre durante os três primeiros dias da inoculação das leveduras. No entanto a sua duração depende da temperatura. Quanto mais baixa for a temperatura do meio (mosto), mais demorada é a adaptação das leveduras. A densidade do mosto não diminui, pois não há consumo suficiente de glucose. Seguidamente ocorre a fase exponencial, usualmente dura de 3 d a 6 d após a inoculação. Nesta fase denota-se um decréscimo abrupto da densidade o que indica atividade máxima das células. Após atingido o pico de atividade máxima e eficiência fisiológica, ocorre a fase estacionária. A velocidade de fermentação diminui com a metabolização das últimas moléculas de glucose e as leveduras já não são capazes de se multiplicar, permanecendo em número constante. Durante toda esta fase, a atividade das leveduras diminui progressivamente e ocorre acumulação de produtos metabólicos tóxicos ou exaustão dos nutrientes; algumas células morrem enquanto outras se dividem. Por fim, com o excessivo acumular de produtos metabólicos inibitórios, e falta de nutrientes essenciais, ocorre a morte das leveduras. A taxa de morte é acelerada, o número de células viáveis diminui de forma exponencial.

A fermentação alcoólica ocorre em três etapas, sintetizadas na equação I.1:

- Transformação das hexoses/açúcares (frutose e glucose) em ácido pirúvico – glicólise;
- Descarboxilação do ácido pirúvico a acetaldeído; e
- Redução do acetaldeído a etanol.



Em simultâneo à fermentação alcoólica ocorre a fermentação gliceropirúvica, ou seja, produção de glicerol a partir das hexoses (frutose e glucose). Ocorre essencialmente nos primeiros estádios da fermentação, quando a levedura usa os substratos para se multiplicar e sintetizar outros metabolitos essenciais a partir do piruvato. O glicerol é o

---

terceiro composto mais abundante dos vinhos. Confere suavidade e doçura ao produto final.

Além do etanol e do glicerol, a fermentação origina muitas outras substâncias, produtos secundários. A natureza e concentrações dos produtos formados dependem do estado sanitário e do grau de maturação da uva, da estirpe de levedura que conduz a fermentação, das castas presentes no mosto e por fim das condições do meio durante o processo de fermentação (arejamento, temperatura e nutrientes). Os produtos secundários acabam por diferenciar cada vinho e por isso tornam-no uma bebida agradável e bem complexa. Alguns desses produtos da panóplia de todos os passíveis de se formar são, o ácido acético, o ácido succínico, os álcoois superiores, os ácidos gordos voláteis, os ésteres e os compostos sulfurados.

Por vezes, a fermentação torna-se bastante lenta no final do processo, sendo que as leveduras reduzem abruptamente o consumo dos açúcares fermentescíveis (glucose e frutose). A elevada concentração de açúcares, as temperaturas extremas, a anaerobiose completa, a carência de nutrientes, a presença de fungicidas e a presença de ácidos gordos de cadeia média, são alguns dos fatores que influenciam diretamente o decorrer da FA.

#### Influência da temperatura

A temperatura é um dos fatores que tem influência sobre o crescimento e o processo fermentativo das leveduras. Afeta a velocidade de fermentação, o rendimento em etanol, o metabolismo de produtos secundários e a acumulação de recetores de SO<sub>2</sub>. Como tal, durante a FA deve-se efetuar o controlo da temperatura (Torija *et al.*, 2002).

É recomendado manter a temperatura abaixo de 20 °C para a fermentação de vinho branco. Para temperaturas abaixo de 13 °C dificilmente ocorrerá uma fermentação, assim como, para temperaturas superiores a 32 °C, onde a atividade microbiana cessa (Rizzon *et al.*, 2006). Alterações de temperatura demasiado bruscas não são aconselháveis durante o processo, podendo mesmo ocasionar a morte dos microrganismos conduzindo a uma indesejável interrupção da FA (Peynaud *et al.*, 2004).

Quanto mais alta for a temperatura, mais rápido é o início da fermentação e menor é o grau alcoólico obtido. Sob temperaturas elevadas, as leveduras apresentam menor tolerância ao etanol e tem maior dificuldade em assimilar os compostos azotados. Por

outro lado, a fermentação realizada a baixas temperaturas, apresenta um sensível melhoramento nas características sensoriais do vinho. Produz-se maior rendimento de álcool, menor perda de aromas de origem varietal, maior formação de ésteres (odores agradáveis a frutos), vinhos mais ricos em dióxido de carbono, menor conteúdo de glicerol e menor formação de ácidos voláteis (Torija *et al.*, 2002).

## 6. Compostos odoríferos das uvas e dos vinhos

O olfato é um dos cinco sentidos humanos. Por meio do olfato, o Homem, assim como os demais animais, capta diferentes odores. Os odores podem ser classificados em agradáveis ou desagradáveis. O cheiro e a memória estão ligados. O odor está ligado com a experiência. Ao cheirar algo conhecido evocamos a memória, chama-se: “efeito de Proust” (Chu e Downes, 2000).

O principal órgão do sistema olfativo é o nariz. As moléculas do aroma que se encontram dissolvidas no ar, no momento em que são inspiradas, o ar entra pelo nariz e alcança as células olfativas localizadas no topo da cavidade nasal. As células olfativas devidamente estimuladas enviam impulsos nervosos ao cérebro, onde são produzidas as sensações. No entanto, existem duas outras formas de ativar os receptores olfativos; a via retronal, pela cavidade bucal e trajeto até ao epitélio olfativo e a via hematogénica ou intravascular, pela passagem do sangue para os pulmões e trajeto até ao epitélio olfativo com expiração do ar.

Para produzir cheiro, uma dada substância deve possuir determinadas propriedades, a volatilidade, a solubilidade em água (uma substância totalmente insolúvel em água não atingirá os pontos do nervo olfativo) e a solubilidade em lípidos (permitindo-lhe penetrar nos terminais do nervo olfativo através das camadas lipídicas que fazem parte da membrana de cada célula) (Peixoto, 1994). A intensidade de uma sensação olfativa não depende somente da concentração do componente na fase líquida mas também da sua volatilidade, da sua pressão de vapor e do seu limiar de percepção olfativo. O limiar de percepção pode ser definido como o mais pequeno estímulo capaz de produzir uma sensação olfativa em pelo menos 50 % dos provadores de um júri (Meilgaard *et al.*, 1999).

As propriedades odoríferas têm influência na aceitação ou na rejeição do produto final, neste caso do vinho (Martí *et al.*, 2003). De entre os compostos que constituem a mistura complexa que é o vinho, apenas as substâncias voláteis são capazes de estimular os órgãos sensoriais responsáveis pelo olfato. São moléculas de pequeno tamanho e peso molecular compreendido, geralmente, entre  $30 \text{ g mol}^{-1}$  e  $300 \text{ g mol}^{-1}$  (Morrot e Brochet, 2000). A combinação dos diferentes compostos voláteis, como álcoois, ésteres, ácidos

orgânicos, aldeídos, cetonas e terpenos, entre outros, formam o carácter dos vinhos, permitindo inclusive diferenciá-los (García-Jares *et al.*, 1995).

No vinho foram identificados, até ao momento, mais de 1 000 componentes odoríferos, com concentrações desde algumas centenas de mg L<sup>-1</sup> até poucos µg L<sup>-1</sup> ou mesmo ng L<sup>-1</sup>. A formação de aroma é influenciada por alguns fatores como, o ambiente (solo, clima), o tipo de casta, a maturação, as condições de fermentação, os fatores biológicos (leveduras e bactérias) e o processo de produção e de envelhecimento (Vilanova e Oliveira, 2012).

Uma melhor compreensão dos principais componentes do aroma contribui para o controlo de qualidade e pode ter um impacto para a viticultura e o processo tecnológico do vinho (Bonino *et al.*, 2003).

### 6.1 Classificação do aroma do vinho

Tendo em conta a tecnologia aplicada na elaboração do vinho, o aroma pode ser classificado em quatro categorias distintas: varietal, pré-fermentativo, fermentativo e pós-fermentativo (Bayonove *et al.*, 1998). Segundo Peynaud (1980) e Lepe (1995), pode-se designar por aroma primário o conjunto do aroma varietal e do pré-fermentativo, por aroma secundário o fermentativo e por aroma terciário o pós-fermentativo.

#### Aroma primário

##### **Aroma varietal**

O aroma varietal é característico da variedade de uva, e depende essencialmente tipo de casta e da influência do *terroir*, *i.e.*, do tipo de solo, do clima, da fitotecnia (Stidwell, 2001). Depende também do estado sanitário e do grau de maturação da uva. Divide-se em três grandes grupos:

- i. Aroma varietal livre, formado pelas substâncias voláteis e odoríferas presentes;
- ii. Precursores de origem varietal (precursores não voláteis e inodoros – *e.g.* glicosídeos – e os compostos voláteis odoríferos);
- iii. Aromas pré-fermentativos – em alguns casos podem contribuir para o aroma varietal (Baumes *et al.*, 1994).

---

Normalmente o mosto de uvas é praticamente inodoro. No entanto, as uvas podem produzir um vinho com características aromáticas específicas da casta de onde provêm. Estas substâncias inodoras, que produzem aromas varietais no vinho são conhecidas como precursores de aroma, *e.g.* os ácidos gordos, os glicosídeos, os carotenóides e os compostos fenólicos (Cordonnier e Bayonove, 1978).

Os componentes odoríferos das uvas têm um papel essencial na qualidade e no carácter regional dos vinhos, sendo responsáveis pelo aroma varietal dos mesmos. A personalidade aromática individual dos vinhos é devida às infinitas combinações e concentrações dos diferentes compostos. Os componentes odoríferos, que foram mais estudados de castas de *V. vinifera*, pertencem à família química dos terpenos. Outros compostos envolvidos no aroma varietal são os norisoprenóides em C<sub>13</sub>. Acredita-se que são estes os que mais contribuem qualitativamente no aroma varietal (Silva, 2000).

### **Aroma pré-fermentativo**

Aroma que apesar de apenas ser revelado durante o processamento da vindima, é também originário das uvas. Pode ser divulgado apenas no início da fermentação alcoólica, nomeadamente transporte, prensagem, maceração e clarificação. Este aroma é essencialmente devido a álcoois e aldeídos com seis átomos de carbono (Bayonove *et al.*, 1998).

Compostos em C<sub>6</sub>, apresentam um aroma herbáceo (Bayonove *et al.*, 1998). Diferentes autores concordam em que o maior potencial herbáceo se atinge antes da maturação comercial, mas está também dependente da variedade (Cordonnier e Bayonove, 1981; Bayonove *et al.*, 1998). Os compostos em C<sub>6</sub> incluem o 1-hexanol, o (Z)-3-hexenol e o (E)-2-hexenal.

### **Aroma secundário**

O aroma secundário do vinho é proveniente da atividade das leveduras durante a fermentação alcoólica, bem como pelas bactérias lácticas no caso de ocorrer uma fermentação malolática. Condições das fermentações, essencialmente a temperatura e estirpe de levedura usada são os fatores mais importantes que influenciam o aroma secundário dos vinhos (Cardoso dos Santos, 2003).

A fermentação alcoólica fornece o carácter vinoso que constitui a base aromática de todos os vinhos. Além disso, os compostos voláteis originados nesta etapa representam quantitativamente a maior parte do aroma. Os componentes que fazem parte do aroma secundário são essencialmente álcoois, ácidos gordos voláteis e os seus ésteres e em menor quantidade, aldeídos.

Os álcoois superiores encontram-se praticamente ausentes nos mostos, mas podem-se encontrar nos vinhos em concentrações relativamente elevadas; no seu conjunto, os compostos podem apresentar teores superiores a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , atingindo por vezes algumas centenas de  $\text{mg L}^{-1}$  (Curvelo-Garcia, 1988). Os principais álcoois superiores dos vinhos, com teores frequentemente superiores a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  são o 2-metil-1-propanol, o 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), o 2-metil-1-butanol e o 2-feniletanol.

No caso das bebidas alcoólicas, os álcoois superiores desempenham um importante papel no aroma (Fleet, 1993). A formação de álcoois superiores ocorre por duas diferentes vias:

- i. Via catabólica – a partir de determinados aminoácidos por intermédio do mecanismo de Ehrlich. Por este processo, os álcoois são formados por degradação dos aminoácidos mediante um mecanismo que engloba desaminação, descarboxilação e redução, sucessivamente;
- ii. Via anabólica – a partir do metabolismo dos açúcares via piruvato, tendo como intermediários os ácidos cetónicos (Lepe, 1995).

Os ácidos gordos voláteis e os seus ésteres são, juntamente com os álcoois superiores, os principais responsáveis pelo aroma fermentativo dos vinhos.

Os ácidos gordos voláteis formados a partir dos  $\alpha$ -cetoácidos são principalmente o propanóico, 2-metil-1-propanóico (isobutírico), o 2-metil-1-butanóico, e o 3-metil-1-butanóico (isovalérico). Os provenientes do metabolismo dos lípidos são ácidos gordos com número par de átomos de carbono como o ácido butanóico (butírico), o ácido hexanóico (capróico), o ácido octanóico (caprílico) e o ácido decanóico (cáprico). Os ácidos gordos possuem odores considerados negativos, mas a sua concentração raramente atinge o limiar de perceção olfativo. São mesmo necessários para um bom equilíbrio do aroma fermentativo (Etiévant, 1991).

Os ésteres apresentam individualmente odores agradáveis, principalmente frutados, com exceção do acetato de etilo cujo odor, não é bem aceite para valores

superiores a limite próximo de 100 mg L<sup>-1</sup> (Bayonove *et al.*, 1998). A sua formação está dependente da formação ácidos gordos pelas leveduras.

Os ésteres etílicos mais importantes para a qualidade do aroma são os de cadeia curta. Alguns dos exemplos mais importantes são, o lactato de etilo, o butanoato de etilo, o hexanoato de etilo, o octanoato de etilo, e o decanoato de etilo.

### Aroma terciário

O aroma terciário, conhecido também pelo *bouquet*, é motivado por reações de oxirredução nos estágios em que ocorre conservação, geralmente em barrica e mais tarde, durante o envelhecimento. Pode ser dividido em dois grupos: o aroma de oxidação, derivado da madeira que constitui o casco e também como resultado da passagem lenta do oxigénio, através as paredes porosas da madeira, oxidando os constituintes do vinho e, o aroma de redução, cujos compostos resultam do envelhecimento em garrafa.

Nos componentes pós-fermentativos estão incluídos aqueles extraídos de madeira como por exemplo, vanilina (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Masneufe *et al.*, 2002).

## 7. Papel das leveduras no aroma do vinho

Os aromas de vinhos comerciais são resultado da uva em si e das atividades biológicas levadas a cabo pelos microrganismos presentes. Várias espécies de leveduras e bactérias, e em alguns casos fungos filamentosos, podem estar presentes durante a fermentação do mosto, sendo responsáveis pelas características finais do vinho (Rainieri e Pretorius, 2000).

Tradicionalmente a fermentação ocorre com as leveduras autóctones que estão presentes na película das uvas frescas durante a vindima ou são introduzidas pelo equipamento na adega durante o processo de vinificação. As leveduras que conduzem a fermentação alcoólica contribuem de forma decisiva para a estrutura, complexidade e individualidade do perfil aromático de vinhos.

A flora de leveduras presente nas uvas depende de uma vasta gama de fatores tais como as condições climatéricas, entre as quais temperatura e queda de chuva, a localização geográfica da vinha, as aplicações de fungicidas, a variedade e idade da vinha, bem como o tipo de solo (Barnett *et al.*, 2000).

### 7.1 Estirpes vínicas

Estudos recentes indicam que as espécies predominantes nas uvas são leveduras apiculadas como *Kloeckera apiculata* e espécies oxidativas dos géneros *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Rhodotorula*. Contrariamente, as leveduras elípticas do género *Saccharomyces*, sobretudo *S. cerevisiae*, em bagos são intactos e nos solos, aparecem em número extremamente baixo; no entanto, nas uvas danificadas são uma fonte importante (Schuller *et al.*, 2005).

#### *Saccharomyces* vs não-*Saccharomyces*

Estirpes do género *Saccharomyces* são vulgarmente encontradas na microflora da superfície das uvas, podendo também ser isoladas de frutos em estado de apodrecimento. São também encontradas nas adegas como parte integrante da bioflora destes locais. Estudos comprovam que a bioflora das adegas domina a fermentação de mostos em detrimento das estirpes encontradas nas vinhas (Mortimer e Polsinelli, 1999).

Para além de *S. cerevisiae*, são normalmente encontrados espécies de outros géneros como *Candida*, *Kluveromyces* e *Pichia*. A presença e persistência destes géneros não-*Saccharomyces* na fermentação são condicionadas por vários fatores tais como, a temperatura, a adição de nutrientes, o arejamento e o contato com a película da uva (Bisson, 2004).

Na fase inicial das fermentações predominam as leveduras não-*Saccharomyces*, mantendo-se em crescimento até uma concentração de etanol próxima de 4 % a 5 %. Posteriormente, devido à baixa tolerância ao etanol demonstrada pelas leveduras não-*Saccharomyces*, a fermentação passa a ser dominada por uma ou mais estirpes de *S. cerevisiae* (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998; Mills *et al.*, 2002).

### ***Saccharomyces cerevisiae***

A levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo não patogénico, e devido a sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis como o vinho e o pão, ela foi classificada como microrganismo geralmente considerado seguro (GRAS – *generally regarded as safe*) (Ostergaard *et al.*, 2000).

*S. cerevisiae* é um microrganismo aeróbio facultativo, *i.e.*, que tem a capacidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose. Os produtos finais do metabolismo do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, em aerobiose, o açúcar é transformado em biomassa, CO<sub>2</sub> e água, e, em anaerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO<sub>2</sub>, processo denominado de FA.

No que diz respeito ao seu papel enológico podem destacar-se inúmeras vantagens tais como, a elevada tolerância e produção de etanol, a elevada atividade fermentativa (consumo completo de açúcares), a produção de glicerol, a baixa produção de SO<sub>2</sub>, a capacidade de crescimento a baixas temperaturas e a elevadas concentrações de açúcar e, por fim, mas não menos importante, a produção de compostos do aroma.

## **7.2 Leveduras secas ativas**

Algumas culturas *starter* (culturas de arranque), também designadas por estirpes industriais ou leveduras secas ativas (LSA) são hoje largamente utilizadas, uma vez que

possuem boas capacidades fermentativas e enológicas, contribuindo para a padronização do processo de fermentação e aumento da qualidade do vinho (Schuller e Casal, 2006).

Estirpes industriais são consideradas estirpes cultivadas em condições comerciais para gerar inóculos de levedura desidratada. Estas estirpes têm de ser capazes de manter a viabilidade durante o processo de desidratação/reidratação (Bisson, 2004). As condições nas quais as estirpes industriais são produzidas poderão ser responsáveis pela variação genómica obtida. As estirpes industriais têm surgido após a caracterização fisiológica de isolados indígenas.

Os bons candidatos destacam-se pela sua adaptação aos processos de produção industrial de levedura e pelos seus atributos na produção do vinho como a tolerância ao etanol e ao dióxido de enxofre, a fermentação completa de açúcares, a ausência de produção de compostos deteriorantes, a capacidade para ultrapassar condições adversas de fermentação e a tolerância a outros microrganismos (Schuller *et al.*, 2005).

É possível selecionar, em cada vinha, estirpes autóctones únicas, que permitem criar vinhos diferenciados. Pode-se então afirmar que não são apenas as características varietais das uvas que modelam as propriedades sensoriais do vinho. A partir do mesmo mosto é possível produzir vinhos com aromas muito distintos, variando apenas a estirpe de levedura utilizada no processo fermentativo. Desta forma, é possível obter vinhos diferenciados, direcionados para as preferências específicas de cada mercado ou de grupo de consumidores (Figura 1.3).

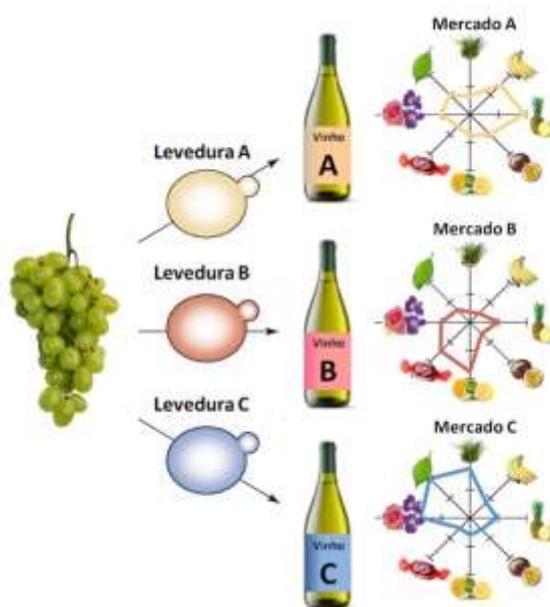


Figura 1.3 - Esquema da uva ao produto final utilizando LSA, (Adaptado de Borneman *et al.*, 2007).

---

Atualmente, existem cerca de 200 LSA e a maioria dos produtores de vinhos na Europa recorrem à sua utilização, visando um melhor controlo do processo fermentativo. São considerados fator de garantia para uma fermentação rápida e consistente, e mantêm a homogeneidade de vinhos em anos consecutivos. Esta prática tem resultado em vinhos mais uniformes sem a típica contribuição dos aromas e sabores provenientes de uma flora de leveduras indígenas (Vieira *et al.*, 2010).

O uso de espécies/estirpes autóctones é sempre preferível devido à sua melhor adaptação ao microecossistema e às condições climatéricas de cada região, à capacidade de predominância sobre a flora microbiana não desejável, bem como à manutenção das propriedades sensoriais e do perfil característico dos vinhos de cada região (Vieira *et al.*, 2010). Apesar da sua longa história e tradição enraizada como país produtor de vinhos, em Portugal foram selecionadas apenas três estirpes comerciais de *S. cerevisiae* das regiões vitivinícolas do *Vinho Verde* (Lalvin QA23<sup>®</sup>), *Dão* (Lalvin QD145<sup>®</sup>) e *Bairrada* (Lalvin BA11<sup>®</sup>).

#### Estirpe comercial de *S. cerevisiae* (Lalvin QA23<sup>®</sup>)

A levedura de vinificação conhecida por Lalvin QA23<sup>®</sup> é uma levedura da espécie *S. cerevisiae*, incluída no grupo da antiga *S. bayanus*. De acordo com a especificação técnica apresentada pelo fabricante, é recomendada principalmente para a elaboração de vinhos brancos. Assim, esta estirpe já comercializada funcionou como amostra padrão no estudo.

#### **7.2.1 A escolha da levedura**

Quando se vinifica, o uso da estirpe de levedura adequada permite expressar o potencial aromático da uva em causa. De facto, a maior parte dos compostos voláteis do aroma presentes na uva encontram-se sob a forma de precursores, *i.e.*, ligados aos açúcares ou aos aminoácidos que, se por um lado os protegem da oxidação, por outro limitam a sua volatilidade e impedem a sua perceção olfativa. A fim de poderem ser olfativamente ativos, os compostos odoríferos devem ser libertados da ligação com o resíduo glicosídico ou aminoacídico. A hidrólise bioquímica mediada por leveduras dotadas das necessárias atividades enzimáticas é a via mais rápida para obter vinhos que

expressem de modo notório os aromas primários da uva. Estirpes com atividade  $\beta$ -glicosidásica, por exemplo, libertam as formas glicosiladas de terpenos e norisoprenóides; já leveduras com atividades  $\beta$ -liase, por seu lado, rompem a ligação entre a cisteína e os tióis, compostos sulfurados responsáveis pelo aroma (Triulzi e Scotti, 2008).

Para além do acima referido, é importante escolher uma levedura capaz de produzir compostos voláteis do aroma (aroma secundário). No entanto, é indispensável prestar atenção à sua nutrição. A nutrição azotada da levedura tem um grande impacto sobre a qualidade aromática do vinho, os aminoácidos, em particular, são precursores na síntese de álcoois superiores, de aldeídos, de ácidos carboxílicos, e, indiretamente, dos ésteres. Portanto para que uma estirpe de levedura possa utilizar os aminoácidos como precursores na síntese de compostos do aroma, deve encontrar-se em boas condições nutritivas, *i.e.*, não se deve encontrar na situação de necessitar deles para a síntese de proteínas ou para produzir energia (Malajovich, 2011).

Portanto, quando se utilizam leveduras com potencialidade de enaltecer as características aromáticas do produto final é fundamental assegurar-se as suas condições ótimas de desenvolvimento. Pois, caso contrário compromete-se a sua capacidade de sintetizar compostos voláteis do aroma.

---

## 8. Análise sensorial

Segundo a norma NP 4263:1994, pode-se definir Análise Sensorial ou Exame Organolético como o “exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos”. O termo organolético é definido como sendo o que “qualifica uma propriedade de um produto perceptível pelos órgãos dos sentidos”.

O exame organolético ou prova sensorial consiste na apreciação através de três dos cinco sentidos: a visão, o gosto e o olfato. Os três exames são realizados pela seguinte ordem:

- i. exame visual;
- ii. exame olfativo; e
- iii. exame gustativo.

A visão permite avaliar diferentes parâmetros tais como a cor, a limpidez e a intensidade. Cada casta tem as suas características próprias, e a cor depende de vários fatores, destacando-se o envelhecimento. Nos brancos, o envelhecimento provoca a mudança da cor citrino descorado (vinhos jovens) para dourado (vinhos envelhecidos). No que diz respeito à limpidez, está dependente dos processos tecnológicos a que o vinho esteve sujeito, tais como trasfegas, filtrações, centrifugações, e à presença (ou não) de alterações químicas e microbiológicas. Deve-se inclinar suavemente o copo de modo a criar uma superfície elíptica, e portanto maior, para facilitar a observação do vinho.

O vinho é composto por uma série de moléculas voláteis com poder odorífero. É com o sentido do olfato que se reconhece e classifica estes compostos. O copo deve ser agitado por forma a facilitar a libertação dos compostos do aroma. Com a aproximação do copo ao nariz, ocorre o fenómeno químico (sensação) que consiste na excitação (inconsciente) do nariz; posteriormente ocorre a deteção/perceção, ou seja assinala-se a presença da sensação e, por fim, procede-se à identificação, sendo capaz de atribuir um nome à perceção passada (Clarke e Baker, 2004).

Por fim, o gosto é o terceiro e último sentido a ser utilizado. As papilas gustativas encontram-se na superfície da língua. São as células sensoriais que percebem os quatro gostos elementares, amargo, ácido, salgado e doce.

Os açúcares (glucose, frutose, entre outros) conferem doçura ao vinho; os ácidos (tartárico, málico, acético, etc.) a acidez. Por sua vez, o gosto a salgado advém dos sais, *e.g.* cloreto de sódio; e o gosto amargo é devido aos compostos fenólicos. O doce é detetado nos primeiros 2 s a 3 s, ao fim de 5 s a 12 s diminui o doce e aumenta progressivamente o ácido e o salgado. No final domina a percepção do gosto ácido e fundamentalmente a do gosto amargo (Jackson, 2002).

A prova dá-se por concluída quando o vinho é caracterizado segundo os três parâmetros, a cor/limpidez, o aroma e o gosto, levando o provador a concluir a maior ou menor originalidade de um vinho, o seu equilíbrio, harmonia e tipicidade.

---

## 9. Metodologias HPLC e FTIR

A cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) é uma técnica de separação e análise em que a amostra é arrastada por um eluente líquido – a fase móvel – através de um adsorvente sólido – a fase estacionária. A fase móvel (eluente) é aspirada a partir de um reservatório por uma bomba e circula por todo o sistema a uma pressão elevada, a um determinado caudal e temperatura. A montante da bomba é colocado normalmente um filtro para evitar a entrada de pequenas partículas no sistema. A amostra a analisar é introduzida por uma seringa no sistema de injeção (constituído por um *loop* de volume fixo) e é arrastada pelo eluente através da coluna cromatográfica que contém a fase estacionária. Muitas separações são efetuadas a temperatura superior à ambiente, sendo necessário nesse caso termostatar a coluna com o auxílio de um forno. À saída da coluna, as substâncias individualizadas passam por um sistema adequado de deteção (*e.g.* espectrofotómetro, refratómetro, etc.) que deve estar acoplado a um computador possuindo *software* adequado a aquisição e processamento dos dados.

O equipamento (*OenoFoss*<sup>TM</sup>) é composto por duas unidades modulares construídas em plataformas semelhantes, uma unidade de análise de vinho via Infravermelho com Transformada de *Fourier* (FTIR) e uma unidade opcional de coloração no visível (VIS). FTIR é uma técnica rápida, que utiliza uma quantidade mínima de amostra (Russell e Fraser, 1994). O princípio da tecnologia FTIR consiste em digitalizar a amostra a analisar pelo espectro infravermelho, numa faixa espectral de componente entre 2 000 nm e 10 000 nm. A luz é absorvida pela amostra de acordo com a aparência de constituintes do vinho, e por fim, a absorção é convertida através transformada de *Fourier*, modelo matemático para uma previsão de a concentração de vários constituintes.

O método FTIR substitui várias soluções de análise demoradas com um único teste realizado no local. É uma solução analítica, simples e rápida de usar, que mede vários parâmetros de mosto de uvas, mosto durante o processo de fermentação e vinho acabado, tornando possível uma análise mais aprofundada e com maior frequência. Em contrapartida, atualmente a técnica HPLC constitui um dos métodos mais poderosos em química analítica, permitindo separar, identificar e quantificar compostos presentes em qualquer amostra solúvel numa matriz líquida.



## II – Materiais e Métodos



## 10. Planeamento Experimental

Como já foi referido na parte I, o objetivo principal em estudo foi testar cinco leveduras (previamente selecionadas) em fermentações à escala piloto (20 L), tendo sido sujeitas às condições gerais de fermentação utilizadas em adega. Paralelamente foi realizado um estudo de microvinificação a um volume de 50 mL.

As amostras finais obtidas, em ambas as escalas, foram analisadas a nível físico-químico. No caso do vinho produzido à escala piloto foi também analisado a nível sensorial, que a par da análise do comportamento fermentativo, contribui para selecionar leveduras com potencial comercial.

### 10.1 Estação piloto

O projeto foi realizado em parceria com a empresa *Yeast Wine - Wine Solutions, Lda*. A empresa possui uma estação piloto, pioneira no país, capaz de recriar as condições gerais de fermentação utilizadas em adega. Esta é constituída por 12 fermentadores/cubas com temperatura controlada através de um *chiller*. Cada fermentador permite acoplar sensores para monitorizar diversos parâmetros. A sua capacidade máxima é de 20 L (Figura II.1).



Figura II.1 - Estação piloto – *Yeast Wine - Wine Solutions, Lda*.

Perante as condições apresentadas é possível testar diferentes leveduras e/ou condições de fermentação, para uma seleção de leveduras direcionada para o estilo de vinho pretendido.

## 10.2 Caracterização do mosto

Foram adquiridos cerca de 240 L de mosto branco dessulfitado, constituído por uvas das castas *Arinto*, *Avesso*, *Trajadura* e *Loureiro*.

O mosto foi caracterizado em relação à sua densidade e álcool provável por aerometria (método OIV-MA-AS2-01B:R2009); açúcares e ácidos orgânicos por HPLC e pH por FTIR. O mosto apresentou uma densidade de 1,071 atribuindo assim um grau de álcool provável 8,8 % vol. e máximo de concentração de açúcares disponível de 159 g L<sup>-1</sup>. Pelo método FTIR foi encontrado um valor de pH igual 3,35.

A Tabela II.1 expõe a caracterização do mosto pelo método HPLC.

Tabela II.1 Concentração (C) de hexoses e ácidos orgânicos, e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

		C/(g L <sup>-1</sup> )
<b>Hexoses</b>	Glucose	88,55 ± 13,72
	Frutose	92,02 ± 14,19
<b>Ácidos orgânicos</b>	Cítrico	0,33 ± 0,07
	Tartárico	1,06 ± 0,13
	Málico	2,44 ± 0,22

## 11. Inoculação das estirpes de *S. cerevisiae*

Neste estudo foram utilizadas cinco estirpes de *S. cerevisiae* (BE, M, F, S e CM) e também a comercial Lalvin QA23® (Lallemand) usada como referência. As cinco estirpes testadas foram anteriormente isoladas e selecionadas pela empresa Vinalia.

Primeiramente foi estabelecida a correlação entre a absorvência ( $DO_{620 \text{ nm}}$ ) – *Multiskan Go, Thermo scientific* – e a concentração celular ( $n$  – n.º de células por unidade de volume) de cada uma das estirpes, que foi determinada por contagem em câmara de *Neubauer*.

Foram preparados pré-inóculos em 25 mL de meio YPD (20 g L<sup>-1</sup> glucose; 10 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 10 g L<sup>-1</sup> bactopeptona), a partir de estirpes armazenadas em glicerol (30 mL L<sup>-1</sup>, -80 °C), que cresceram durante 48 h (30 °C, 200 min<sup>-1</sup>). Os inóculos foram realizados em 200 mL de meio YPD correspondentes a 10 % do volume do fermentador (20 L), e incubaram-se durante 48 h (30 °C, 200 min<sup>-1</sup>) de forma a atingir uma concentração celular de aproximadamente  $n \approx 1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ .

A Tabela II. 2 estabelece a correlação entre a concentração celular de cada estirpe estimada pela leitura da absorvência a 620 nm e o volume de suspensão celular de cada estirpe inoculado em 20 L de mosto.

Tabela II.2 Correlação entre concentração celular ( $n$ ) e volume de suspensão celular ( $V$ ) de cada estirpe, inoculado em 20 L de mosto

Estirpe	$n$	V/mL
<b>BE</b>	$1,9 \times 10^8$	110
<b>M</b>	$1,25 \times 10^8$	160
<b>F</b>	$1,10 \times 10^8$	182
<b>S</b>	$1,07 \times 10^8$	187
<b>CM</b>	$1,04 \times 10^8$	192
<b>Lalvin QA23®</b>	$1,04 \times 10^8$	192

## 12. Fermentação alcoólica

As fermentações foram conduzidas em duas escalas:

- Escala piloto, para avaliação do comportamento fermentativo das estirpes (20 L); onde foram produzidos vinhos doces (interrupção da FA) e vinhos secos (até valor de densidade constante);
- Microescala, nas condições determinadas pela OIV (Organização Internacional do Vinho e da Vinha) para a seleção de leveduras, de modo a avaliar a representatividade desta metodologia (50 mL).

As amostras foram analisadas em duplicado, visando o tratamento estatístico dos resultados obtidos. Assim, os resultados que serão apresentados na parte III consistem na média obtida e respetivo erro associado. O erro associado foi calculado pela equação II.1, onde  $t_\alpha$  é o valor tabelado da distribuição de  $t$  de *Student* para o nível de confiança,  $S_x$  é o desvio padrão associado às amostras e por fim  $n$  é o número de amostras.

$$Erro = t_\alpha \times \frac{S_x}{\sqrt{n}} \quad (\text{equação II.1})$$

### 12.1 Fermentação à escala piloto

As fermentações foram realizadas em duplicado para cada estirpe, num volume de 20 L, e com temperatura controlada (18 °C). O progresso das fermentações foi monitorizado pela medição diária da densidade por aerometria, segundo o método OIV-MA-AS2-01B: R2009, descrito pela OIV.

Foram realizadas remontagens diárias, visando o arejamento das fermentações, até o valor da densidade se encontrar próximo de 1,040. As fermentações foram terminadas (adicionando SO<sub>2</sub>) quando a densidade atingiu valores aproximados de 1,030 e até valor constante de densidade, para os duplicados de cada estirpe.

Segundo o Regulamento (CE) n.º 606/2009, o limite legal do teor de SO<sub>2</sub> total para vinhos brancos e rosés é 200 mg L<sup>-1</sup>. A dose adicionada a cada cuba foi 120 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub> total. O método de sulfitação consistiu na utilização do metabissulfito de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) em pó, permitindo a sua dissolução completa e garantindo assim uma boa

homogeneização. Posteriormente foi feita a decantação a 6 °C por 2 d a 3 d na cuba de fermentação.

O doseamento do SO<sub>2</sub> livre e combinado, foi realizado por titulação iodométrica direta e, por titulação iodométrica após hidrólise alcalina, respetivamente (Anexo A) conforme a metodologia estabelecida pela OIV (OIV-MA-AS323-04B: R2009 e OIV-MA-AS323-04C: R2009). Antes do engarrafamento, o teor de SO<sub>2</sub> foi corrigido de forma a obter-se uma concentração de SO<sub>2</sub> livre próxima de 40 mg L<sup>-1</sup>, e as garrafas foram armazenadas em local refrigerado (aproximadamente a 4 °C) até à realização da análise sensorial.

## 12.2 Fermentação em microescala

Paralelamente às fermentações conduzidas na estação piloto foram realizadas, em triplicado, microfermentações num volume de 50 mL de mosto inoculado. As microfermentações decorreram em balões de *Erlenmeyer* acoplados com válvula de *Müller* (Figura II.2), conforme estabelecido pela diretiva da OIV-OENO 370-2012 para a caracterização de leveduras vínicas do género *Saccharomyces* isoladas de ambientes vitivinícolas.

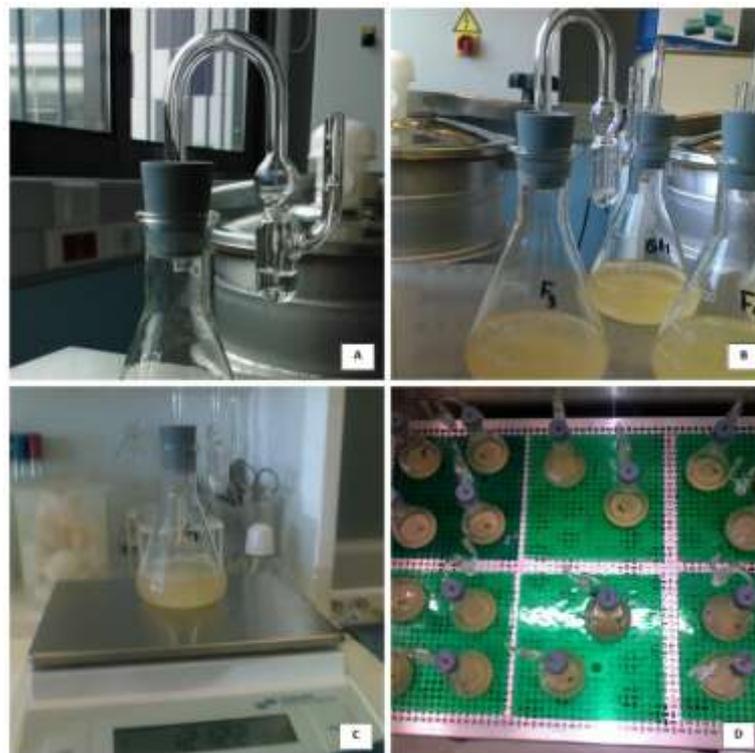


Figura II.2 - Fermentação em microescala (microfermentações).

A- válvula de *Müller*, B, C e D- aspeto geral.

Na válvula de *Müller* (Figura II.2, A) foi adicionado 1 mL de solução alcoólica de glicerol estéril a 30 mL L<sup>-1</sup>, funcionando como um filtro de ar, de modo a prevenir contaminações.

As amostras foram incubadas, sem agitação, a uma temperatura de 18 °C. A monitorização da fermentação foi realizada por pesagem diária das amostras, até peso constante (variação igual ou inferior a 10 mg).

### 13. Caracterização dos mostos em fermentação e dos vinhos

Tendo em conta o estudo à escala piloto, foram recolhidas amostras do mosto em fermentação com densidades próximas de 1,050 e 1,030, visando a sua análise utilizando tecnologia FTIR (equipamento *Oenofoss*<sup>TM</sup>). Utilizou-se o programa predefinido para “mosto em fermentação”. Os parâmetros analisados foram a glucose, a frutose e o título alcoométrico volúmico (*TAV*).

O vinho final produzido à escala piloto foi analisado recorrendo à análise cromatográfica por HPLC (açúcares, ácidos orgânicos, glicerol e *TAV*), bem como pela tecnologia FTIR (equipamento *Oenofoss*<sup>TM</sup>), utilizando o programa predefinido “vinho final”. Neste caso avaliou-se o pH e a acidez total. Foram ainda determinados os compostos voláteis do aroma por cromatografia de gases (GC-MS e GC-FID).

No que diz respeito às fermentações em microescala, as amostras (vinho) foram analisadas apenas recorrendo à análise cromatográfica HPLC e tecnologia FTIR, avaliando os mesmos parâmetros citados na escala piloto.

Todas as amostras, independentemente da escala em estudo, foram congeladas até ao dia da análise.

#### 13.1 Ácidos orgânicos, açúcares, glicerol, etanol, ácido acético, acidez total e pH

Os ácidos orgânicos (cítrico, tartárico e málico), os açúcares (glucose e frutose), o glicerol, o ácido acético e o etanol (*TAV*) foram analisados num HPLC constituído por uma bomba Jasco 880-Pu, detetores UV/Vis Jasco 870-UV e RI Jasco 830-RI e forno para aquecimento da coluna. A análise foi efetuada numa coluna *organic acids* Chrompack (300 mm × 6,5 mm), utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 mmol L<sup>-1</sup> como eluente a um caudal de 0,30 mL min<sup>-1</sup>; a temperatura do forno foi de 80 °C. Utilizou-se um *loop* de 20 µL para a injeção da amostra. A deteção dos ácidos orgânicos foi feita por espectrofotometria a 210 nm e a dos açúcares, glicerol e etanol por refratometria.

O processo de quantificação foi efetuado por comparação dos tempos de retenção após a injeção de padrões de concentrações conhecidas e a construção de uma curva de calibração, pelo método do padrão externo.

A acidez total e o pH foram analisados pela tecnologia FTIR (*Oenofoss*<sup>TM</sup>). As amostras analisadas não sofreram qualquer tratamento prévio. Colocou-se cerca de 600 µL da amostra a analisar sob o feixe de luz; fechou-se a tampa do equipamento e este de imediato começou a leitura. Após 2 min os resultados foram mostrados através do *software* próprio do equipamento (Figura II.3). O processo respeitou as regras descritas na OIV-OENO 390-2010.

O equipamento possui análises predefinidas e previamente calibradas, as utilizadas foram o mosto, o mosto em fermentação e o vinho finalizado. Os parâmetros analisados foram sendo mencionados ao longo deste capítulo.

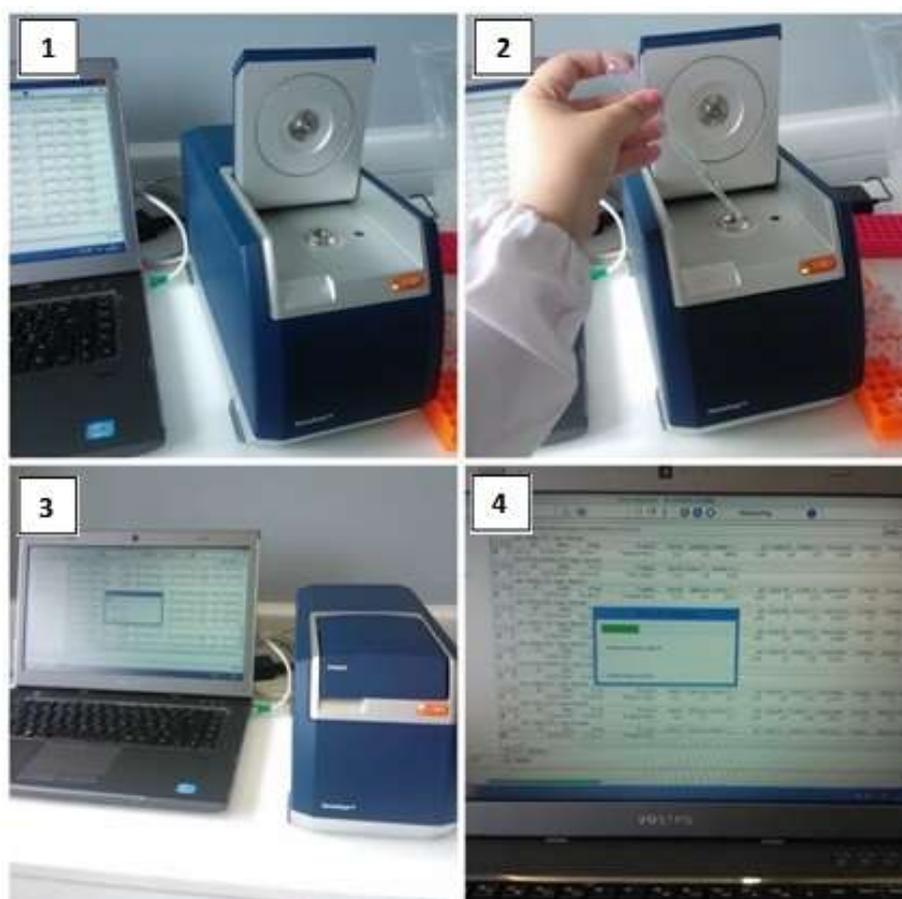


Figura II.3 – Metodologia FTIR - *Oenofoss*<sup>TM</sup>.

### 13.2 Compostos voláteis maioritários

As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 4 °C, durante 10 min e *FCR* =4000 (*FCR* – força centrífuga relativa), numa centrífuga modelo *Sigma*. A seguir, num

tubo de vidro, foram colocados 5 mL de vinho aos quais se adicionou 100  $\mu\text{L}$  de solução de padrão interno (4-nonanol – Merck ref. 818773; 3,54  $\text{g L}^{-1}$ ).

As análises cromatográficas dos vinhos foram efetuadas num cromatógrafo Chrompack GC CP9000 equipado com injetor *split/splitless* e detetor de ionização de chama (GC-FID). Foi usada uma coluna Meta-Wax Teknokroma (50 m  $\times$  0,25 mm; espessura de filme = 0,2  $\mu\text{m}$ ). O gás de transporte foi o hélio GHE4x (Praxair) a um caudal inicial de 1  $\text{ml min}^{-1}$ , *i.e.*, uma pressão à cabeça da coluna, inicialmente, de 75 kPa.

A injeção foi de 1  $\mu\text{L}$  de amostra. As temperaturas do injetor e do detetor mantidas a 250  $^{\circ}\text{C}$ , sendo a razão de *split* de 15  $\text{mL min}^{-1}$ . A temperatura da coluna foi programada de seguinte forma: 50  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 min; depois elevada a 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  dos 50  $^{\circ}\text{C}$  aos 177,5  $^{\circ}\text{C}$ ; a seguir foi incrementada 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  dos 177,5  $^{\circ}\text{C}$  até aos 220  $^{\circ}\text{C}$  e por fim permaneceu 10 min a 220  $^{\circ}\text{C}$ . A análise fez um total de 42,25 min.

A quantificação dos compostos, após determinação dos fatores de resposta do detetor para cada um, foi realizada com recurso ao *software* Star – Chromatography Workstation versão 6.9.3 (Varian), por comparação dos tempos de retenção com os de substâncias de referência puras.

### 13.3 Compostos voláteis minoritários

Inicialmente procedeu-se à extração dos compostos voláteis a partir dos vinhos em estudo. As amostras foram descongeladas no próprio dia e seguidamente centrifugadas a 4  $^{\circ}\text{C}$ , durante 10 min e  $FCR=4000$ . De seguida num tubo (Pyrex, ref. 1636/26MP) foram colocados 8 mL de vinho aos quais se adicionou 100  $\mu\text{L}$  de solução de padrão interno (4-nonanol - Merck ref. 818773; 35,4  $\text{mg L}^{-1}$ ) e uma barra de agitação magnética (22,2 mm  $\times$  4,8 mm). Posteriormente foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de diclorometano (Merck ref. 1. 06054.2500). De seguida a mistura foi colocada em agitação durante 15 min. Depois do arrefecimento a 0  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, a barra de agitação magnética foi retirada e a fase orgânica separada por centrifugação ( $FCR=4000$ , 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ). O extrato foi recolhido com uma pipeta de Pasteur e depois desidratado com sulfato de sódio anidro.

As análises cromatográficas dos extratos dos vinhos foram efetuadas utilizando um sistema GC-MS (constituído por um cromatógrafo gasoso Varian Saturn 2000 equipado com injetor 1079 e detetor de massas *ion-trap* (IT-MS)).

A injeção foi de 1  $\mu\text{L}$  efetuada em modo *splitless* (durante 30 s) sendo a razão de *split* de 30  $\text{mL min}^{-1}$ . A temperatura do injetor e da linha de transferência foram mantidas a 250  $^{\circ}\text{C}$ . Por sua vez, a temperatura da coluna foi programada da seguinte forma, 60  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 min; depois elevada a 3  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  dos 60  $^{\circ}\text{C}$  aos 234  $^{\circ}\text{C}$ ; a seguir foi incrementada 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  dos 234  $^{\circ}\text{C}$  até aos 260  $^{\circ}\text{C}$  e por fim permaneceu 5 min a 260  $^{\circ}\text{C}$ . Perfaz, assim, uma corrida de 70,20 min.

Foi usada uma coluna Sapiens-Wax MS (30 m x 0,15 mm; 0,1  $\mu\text{m}$  de espessura de filme). O gás de transporte foi hélio GHE4x (*Praxair*) a um caudal constante de 1,3  $\text{mL min}^{-1}$ . O detetor foi usado em modo de impacto eletrônico, com energia de ionização de 70 eV e gama de aquisição de massas entre 35  $\text{m z}^{-1}$  e 300  $\text{m z}^{-1}$ , adquirindo a intervalos 610 ms.

A quantificação dos compostos voláteis foi efetuada com recurso ao *software* Star – Chromatography Workstation versão 6.9.3 (Varian), por comparação dos espectros de massas e dos índices de retenção com os dos compostos de referência puros. Todos os compostos foram quantificados como equivalentes de 4-nonanol.

## 14. Prova organolética

A prova organolética foi realizada pelas 11 h numa sala do edifício IEMinho (Soutelo, Vila Verde), a qual foi preparada propositadamente para o efeito (Figura II.4). O local, calmo e confortável, não apresentava odores anormais, e o acesso foi restrito a outros ocupantes durante a realização da prova, impedindo a quebra da concentração do provador. A temperatura da sala foi de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Figura II.4 - Sala de prova.

O copo selecionado para a prova, respeitou a norma ISO 3591:1977, uma vez que a sua forma permite a concentração de aromas.

A prova consistiu na avaliação de 12 diferentes vinhos, sem qualquer intervalo entre amostras. Primeiramente foram servidos os vinhos secos e de seguida os vinhos doces. O vinho foi servido à temperatura aproximada de  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (previamente refrigerado).

Na realização da análise sensorial foi utilizado um painel de 10 provadores não treinados, com idades compreendidas entre os 20 e os 50 anos, na sua maioria género masculino. Apenas duas pessoas de género feminino presentes na prova.

A caracterização do produto foi feita com recurso a uma ficha de prova (Anexo B) avaliando os seguintes atributos: exame visual (limpidez, cor e qualidade da cor), exame

olfativo (intensidade, floral, frutado, especiarias, mineral, vegetal e impressão geral) e exame gustativo (doçura, acidez, calor, amargor, estrutura, equilíbrio, persistência e impressão geral). Para caracterizar cada atributo foi usada uma escala de 1 a 5 valores e de 0 a 20 na nota final (apreciação global).

O tratamento de resultados teve em conta diversos parâmetros explícitos na norma ISO 11035:1994 e recorrendo à ferramenta computacional *MS Excel*<sup>®</sup>. Calculou-se a intensidade relativa (*I*) e a frequência (*F*) de cada atributo que por sua vez serviram como parâmetros chave para o cálculo da média geométrica (*MG*) para descritor do aroma (equação II.2). *F* é o número de vezes que o descritor do aroma é mencionado sobre o número total de vezes possível mencioná-lo (n.º citações); por sua vez *I* é a soma das intensidades atribuídas a cada descritor por todo o painel de provadores, sobre o máximo possível de intensidade.

$$MG/\% = \sqrt{F \times I} \times 100 \quad (\text{equação II.2})$$

## III – Resultados e Discussão



---

Este capítulo está dividido nos dois focos principais do estudo:

- i. Caracterização dos vinhos produzidos à escala piloto – físico-química e sensorial, e;
- ii. Caracterização dos vinhos produzidos em microescala – físico-química.

## 15. Caracterização dos vinhos – escala piloto

### 15.1 Monitorização da FA

Uma vez que a glucose tem densidade superior à do que o etanol, é possível monitorizar o progresso de uma fermentação pela medida da densidade do mosto. Esta diminui progressivamente até valores entre 0,991 e 0,996 (Torija *et al.*, 2002).

Como já foi referido na parte I, capítulo 5, a temperatura de fermentação tem grande influência sobre a atividade das leveduras. Uma temperatura baixa permite um rendimento maior em etanol, não só por uma fermentação mais completa, mas também por minimizar a perda por evaporação e influencia também a quantidade de produtos secundários formados (Hashizume, 2001).

É recomendada a medição da temperatura e da densidade no mínimo duas vezes por dia e de forma constante (Rizzon *et al.*, 2003). O acompanhamento da fermentação é sugerido por meio da medição da temperatura e da densidade ou teor de açúcar, utilizando densímetro ou refratómetro (Hashizume, 2001). No presente estudo, a temperatura da FA foi constantemente controlada pelo *chiller* acoplado à estação piloto e a densidade foi também avaliada diariamente por aerometria.

A remontagem no início da fermentação promove o arejamento necessário à multiplicação das leveduras (Hashizume, 2001). A remontagem foi efetuada desde o início da FA até ser encontrado um valor de densidade próximo de 1,040. A partir deste valor de densidade, optou-se pelo total isolamento do fermentador, uma vez que, é apenas em condições de anaerobiose (ausência de O<sub>2</sub>), que ocorre o processo de fermentação e como tal a produção de etanol (Barnett e Entian, 2005).

Durante a FA, pôde-se verificar algumas características que logo diferenciaram as estirpes ao nível do comportamento fermentativo.

Estirpe BE: verificou-se uma elevada produção de espuma, em relação a todas as outras estirpes. Inicialmente apresentou um leve aroma floral a rosas; no entanto, com o aproximar do fim da FA o aroma foi-se ocultando.

Estirpe M: desde o início até ao fim da FA produziu baixa quantidade de espuma (praticamente nula), tendo sido impossível verificar qualquer atividade fermentativa (borbulhar – sinal de libertação de CO<sub>2</sub>) levando, por vezes, a suspeitar que a FA teria cessado. No entanto os valores de densidade foram progressivamente diminuindo, provando que a FA continuou a ocorrer.

Estirpe F: ao terceiro dia da FA apresentou um forte aroma frutado (lembrando o maracujá); no entanto, este acabou por desaparecer ao longo da FA, tomando o lugar um aroma desagradável a “ovos podres”. Este facto leva a suspeitar uma carência de nutrientes por parte da estirpe.

As estirpes S, CM e Lalvin QA23<sup>®</sup> apresentaram comportamento muito idêntico no decorrer da FA: baixa produção de espuma e cinéticas similares. Os vinhos das estirpes S e CM apresentaram aromas frutados enquanto, o vinho elaborado pela estirpe Lalvin QA23<sup>®</sup> oferecia um aroma floral.

Encontraram-se dificuldades com a refrigeração dos fermentadores, sendo que o *chiller* estaria programado para desligar a refrigeração durante a noite. Assim, o mosto em fermentação já dessulfitado foi mantido a temperaturas superiores a 6 °C o que pode ter influenciado negativamente as características aromáticas do produto final.

As amostras intermédias (densidades próximas de 1,050 e 1,030), recolhidas durante a FA, foram analisadas por FTIR. Assim, foi possível verificar a degradação de açúcares e consequente formação de etanol.

A Figura III.1 representa o decurso do processo metabólico no caso da estirpe S. As outras estirpes apresentam comportamento semelhante (Anexo C).

Entre o 5.º dia e o 14.º dia (final da FA) não constam quaisquer pontos na Figura III.1, uma vez que se optou pela ocorrência da FA em total anaerobiose (impedindo assim a recolha de amostras). No entanto depreende-se que a curva seguisse o comportamento aqui representado.

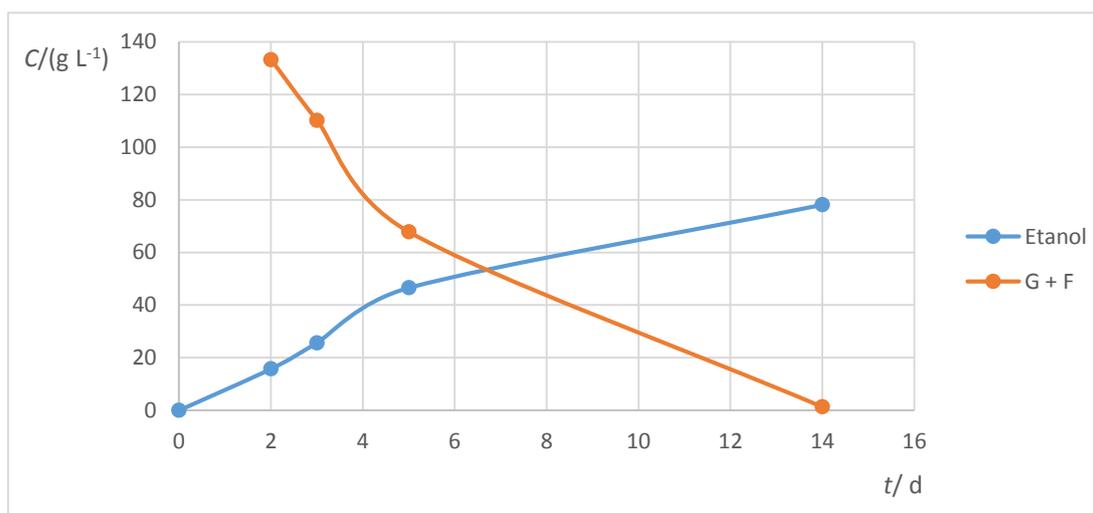


Figura III.1 – Concentração (C) dos açúcares (glucose + frutose, G+F) e formação de etanol ao longo do tempo (t) – estirpe S.

Quando o processo FA foi dado como terminado, foi também adicionada uma dose de 120 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub> a cada cuba. A sulfitação deve ser feita de maneira mais uniforme possível por todo o mosto. O SO<sub>2</sub> é habitualmente usado como conservante, sendo utilizado para a proteção dos vinhos contra a oxidação. Possui propriedades antissépticas e impede a deterioração do vinho provocada por bactérias e bolores, os sulfitos tornam assim o vinho mais estável, prolongam a sua conservação. Possui também efeito sensorial, permitindo a conservação dos aromas e contribuindo para o desenvolvimento de *bouquet* e permite a inibição das leveduras, dependendo da dose adicionada (Pato, 1988).

Como já acima foi referido, o estudo da FA à escala piloto ocorreu tendo em conta duas vertentes:

- Interrupção da FA (deixando açúcar residual) – Caso 1;
- FA até densidade constante – Caso 2.

O tempo de fermentação variou consoante a estirpe em estudo. No entanto, a estirpe Lalvin QA23<sup>®</sup> apresentou uma cinética de fermentação mais rápida em ambos os casos (Tabela III.1). Pode-se verificar que as estirpes F, CM e S mantiveram o mesmo padrão de cinética durante a FA, ficando em 2.º, 3.º e 5.º lugar, respetivamente, em ambos os casos. As estirpes F e CM apresentam cinética de fermentação rápida, sendo capazes de acompanhar a estirpe comercial.

Curioso, e de ressaltar, é o caso das estirpes M e BE. Esta última demorou 10 d a atingir uma densidade 1,006; no entanto a FA terminou 4 d depois, terminando com uma densidade de 1,002. Este facto leva a crer que a estirpe foi incapaz de completar a degradação dos açúcares. Já a estirpe M demorou apenas 9 d a atingir uma densidade 1,003 (mais 1 d que a estirpe comercial). No entanto, o finalizar da FA foi extremamente lento, vindo a terminar apenas 6 d depois.

Tabela III.1 Valores de densidade ( $D$ ) e respetivo tempo ( $t$ ) de FA (Caso 1 e Caso 2) – escala piloto

	Caso 1		Caso 2	
	$t/d$	$D$	$t/d$	$D$
<b>BE</b>	10	1,006	14	1,002
<b>M</b>	9	1,003	15	0,997
<b>F</b>	8	1,004	12	0,996
<b>S</b>	10	1,004	14	0,997
<b>CM</b>	8	1,004	13	0,997
<b>Lalvin QA23®</b>	8	1,001	11	0,996

À exceção da estirpe BE, os valores de densidade encontrados no Caso 2 foram de encontro ao mencionado por Rizzon *et al.* (2003), variando entre 0,996 e 0,997, comprovando que a FA foi completa.

No que diz respeito à produção de espuma destacam-se as estirpes BE e a M. Estirpe BE caracteriza-se pela elevada produção de espuma e estirpe M pela sua quase nula produção. Todas as outras estirpes apresentaram baixa produção de espuma.

## 15.2 Análise química

### 15.2.1 Açúcares, ácidos orgânicos, glicerol, etanol e ácido acético

#### Açúcares – Glucose e Frutose

A composição em açúcares varia consoante a casta, e o estado de maturação e estado sanitário das uvas. Os principais açúcares das uvas são as hexoses, frutose e a glucose (açúcares fermentescíveis), existindo contudo outros açúcares (não fermentescíveis) em proporções mais pequenas (açúcares residuais) como por exemplo as pentoses, ribose e a xilose, e a sacarose. A importância dos açúcares no vinho está

relacionada com o seu contributo para o gosto, através do seu gosto original (doce). No entanto, o seu papel fundamental é a produção de etanol durante a FA (Jackson, 2008).

Os vinhos foram caracterizados segundo o seu teor de açúcares.

O mosto apresentava as seguintes concentrações de glucose e frutose, respetivamente:  $(88,55 \pm 13,72)$  g L<sup>-1</sup> e  $(92,02 \pm 14,19)$  g L<sup>-1</sup>. Na Tabela III.2 são apresentados os valores determinados, por HPLC, referentes ao teor de glucose e de frutose em ambos os casos retratados.

Tabela III.2 Concentrações de glucose ( $C_{Gluc}$ ) e de frutose ( $C_{Frut}$ ), determinados por HPLC, nos vinhos produzidos à escala piloto, e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

	$C_{Gluc}/(g\ L^{-1})$		$C_{Frut}/(g\ L^{-1})$	
	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2
<b>BE</b>	$2,36 \pm 1,30$	$0,40 \pm 0,01$	$11,72 \pm 2,53$	$0,36 \pm 0,01$
<b>M</b>	$6,00 \pm 0,83$	$2,16 \pm 0,72$	$15,30 \pm 3,03$	$3,35 \pm 1,13$
<b>F</b>	$3,92 \pm 0,50$	$0,40 \pm 0,02$	$10,10 \pm 2,59$	$0,37 \pm 0,07$
<b>S</b>	$2,67 \pm 0,72$	$0,40 \pm 0,08$	$7,71 \pm 1,04$	$0,37 \pm 0,25$
<b>CM</b>	$1,85 \pm 0,25$	$0,38 \pm 0,05$	$5,79 \pm 1,15$	$0,29 \pm 0,18$
<b>Lalvin QA23®</b>	$2,35 \pm 0,23$	$0,39 \pm 0,02$	$2,53 \pm 1,52$	$0,34 \pm 0,05$

Verificou-se que a degradação de ambos os açúcares fermentescíveis, pelas estirpes em estudo, foi bem conseguida. Tal como era espectável, aquando da cessação forçada da FA (Caso 1), os teores de açúcar são mais elevados. Isso justifica-se pelo facto de as leveduras terem sido impedidas forçadamente de terminar o consumo dos açúcares e conseqüente produção de etanol.

É de salientar que apesar de a glucose e a frutose coexistirem como substratos, a glucose é mais facilmente consumida. Tal facto está bastante explícito nos valores obtidos no Caso 1. O valor máximo conseguido de glucose é de 6 g L<sup>-1</sup> enquanto a frutose é capaz de mostrar valores na ordem das dezenas, apresentando um máximo próximo de 15 g L<sup>-1</sup>, vinho produzido pela estirpe M.

No Regulamento (CE) n.º 607/2009, de 14 de Julho, encontram-se legislados os limites de concentração de açúcar e respetiva caracterização do vinho. Assim, no Caso 2 (à exceção da estirpe M) todos os vinhos são caracterizados como vinho seco, uma vez que o seu teor de açúcares é aproximadamente 1 g L<sup>-1</sup>, logo inferior a 4 g L<sup>-1</sup>. No caso da estirpe M, a sua concentração de açúcares é cerca de 6 g L<sup>-1</sup> e por isso é já considerado vinho adomado. No Caso 1, as estirpes S, CM e Lalvin QA23® enquadram-se em vinho

adamado, enquanto as estirpes BE, M e F apresentam-se como sendo vinho meio doce, uma vez que o seu teor de açúcares se apresentou superior a  $12 \text{ g L}^{-1}$  mas inferior a  $45 \text{ g L}^{-1}$ .

### Etanol e Glicerol

Na Tabela III.3 são apresentados os valores de concentração de glicerol e de título alcoométrico volúmico (TAV), tendo em conta ambos os casos em estudo.

Tabela III.3 Concentrações de glicerol ( $C_{\text{Glicerol}}$ ) e etanol (TAV) determinados por HPLC, nos vinhos produzidos à escala piloto, e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

	TAV/%		$C_{\text{Glicerol}}/(\text{g L}^{-1})$	
	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2
<b>BE</b>	$9,58 \pm 0,21$	$10,34 \pm 2,44$	$2,83 \pm 0,21$	$3,47 \pm 0,91$
<b>M</b>	$7,26 \pm 0,76$	$10,74 \pm 1,12$	$2,66 \pm 0,52$	$3,54 \pm 0,37$
<b>F</b>	$9,52 \pm 3,09$	$10,92 \pm 0,15$	$3,38 \pm 0,45$	$4,13 \pm 0,37$
<b>S</b>	$7,14 \pm 2,19$	$8,13 \pm 0,18$	$2,46 \pm 0,66$	$2,89 \pm 0,24$
<b>CM</b>	$8,59 \pm 2,94$	$10,43 \pm 2,93$	$3,01 \pm 1,14$	$3,97 \pm 0,71$
<b>Lalvin QA23®</b>	$9,62 \pm 1,71$	$10,87 \pm 1,04$	$2,85 \pm 0,19$	$4,09 \pm 1,67$

O etanol é um dos principais fatores de qualidade de um vinho. As suas funções não se limitam somente à sua influência nas características organoléticas, tendo também um papel muito importante no controlo microbiano (agentes patogénicos) e consequentemente na conservação do vinho. O aumento da concentração de etanol durante a fermentação inibe o crescimento microbiano, mantendo o meio (mosto em fermentação) estável em condições de anaerobiose (Jackson, 2008). O etanol não é um componente originário das uvas mas sim o principal produto da FA sendo, depois da água, o principal componente do vinho.

O teor de etanol num vinho está dependente das condições iniciais do mosto. No entanto, as condições durante a fermentação (*e.g.* temperatura e tipo de levedura) também influenciam a produção de etanol. A levedura *S. cerevisiae*, que é particularmente resistente ao aumento da concentração de etanol e sintetiza 1 % por cada 16,5 g a 17,5 g de açúcares (frutose e glucose) por litro de mosto (Cheynier *et al.*, 2010). Assim, com teor de açúcares apresentados pelo mosto,  $180,6 \text{ g L}^{-1}$  previa-se um TAV próximo dos 11 %.

No Caso 2, obtiveram-se valores de TAV entre 8,13 % e 10,92 %, para as estirpes S e F, respetivamente. No que diz respeito ao Caso 1, os resultados variaram entre 7,14 % e 9,62 %, para as estirpes S e Lalvin QA23<sup>®</sup>, respetivamente. Como se pode verificar, a estirpe S foi a menos capaz de produzir etanol, em ambos os casos estudados. No entanto, pode-se afirmar que todas as estirpes em estudo foram perfeitamente capazes de se apresentar como boas candidatas para a produção de etanol, conseguindo atingir valores idênticos e até superiores aos da estirpe comercial Lalvin QA23<sup>®</sup>. Paralelamente, verificou-se que os valores de TAV, na sua maioria, se encontram dentro do legislado na Portaria n.º 668/2010, estabelecendo um mínimo de 8 % vol. e um máximo de 11,5 %, podendo exceder o limite máximo de acordo com o descrito na mesma. Como exceção, apresentam-se os vinhos produzidos pelas estirpes M e S (Caso 1), não atingindo o mínimo de TAV legislado.

Salienta-se o facto de, apesar, da estirpe M ter terminado a FA (Caso 2) com teor de açúcares bastante elevado (comparativamente com as outras estirpes) ter sido capaz de acompanhar as demais estirpes na produção de etanol, apresentando um valor muito próximo de TAV estimado inicialmente no mosto.

O glicerol é um dos principais produtos secundários da conversão dos açúcares durante a FA realizada pelas leveduras e é produzido sobretudo no início da fermentação (Ribéreau-Gayon, 2006). Tem um gosto ligeiramente doce e contribui para a suavidade, consistência e corpo do vinho. No entanto, não tem um impacto direto nas características aromáticas do vinho devido à sua natureza não volátil (Pretorius, 2000). A quantidade de glicerol presente nos vinhos está dependente de muitas condições. Para além da estirpe e da quantidade de inóculo utilizado, também fatores como o arejamento, a temperatura de fermentação, a composição dos mostos em termos de azoto, açúcares, sulfitos e pH, a casta e a infeção das uvas com *Botrytis cinerea* podem influenciar a concentração final de glicerol (Vieira, 2013).

Os valores de concentração do glicerol encontram-se, geralmente, compreendidos entre 5 g L<sup>-1</sup> e 12 g L<sup>-1</sup> (Navarre, 1997). Os valores encontrados em todas as amostras em análise (Tabela III.3) não foram de encontro ao exposto na bibliografia, ficando muito aquém do limite mínimo esperado. A estirpe F foi a que apresentou maior teor de glicerol em ambos os casos, atingindo um máximo de (4,13 ± 0,37) g L<sup>-1</sup> no Caso 2. Estes valores

poderão ter contribuído negativamente para o produto final; no entanto a própria estirpe comercial Lalvin QA23® apresentou teores inferiores aos referidos na bibliografia. Este facto pode ser justificado pelo facto de a produção de glicerol ser diretamente proporcional à produção de etanol. Assim a estirpe S, que apresentou menor TAV, conseqüentemente apresentou também menor concentração de glicerol ( $2,89 \pm 0,24$ ) g L<sup>-1</sup> e ( $2,46 \pm 0,66$ ) g L<sup>-1</sup>, no Caso 2 e no Caso 1 respetivamente.

### Ácidos orgânicos

A acidez do vinho é devida essencialmente aos ácidos tartárico, málico e cítrico, encontrados em todas as partes da videira. Estes três ácidos são naturais da uva, não estando a sua produção dependente da FA (Magalhães, 2008). Na Tabela III.4 pode-se consultar as concentrações dos diferentes ácidos orgânicos.

Tabela III.4 Concentrações de ácido tartárico ( $C_{Tart}$ ), ácido málico ( $C_{Mál}$ ) e ácido cítrico ( $C_{Cítrico}$ ) determinados por HPLC, nos vinhos produzidos à escala piloto, e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

	$C_{Tart}/(g\ L^{-1})$		$C_{Mál}/(g\ L^{-1})$		$C_{Cítrico}/(g\ L^{-1})$	
	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2
<b>BE</b>	$0,85 \pm 0,42$	$0,93 \pm 0,10$	$2,41 \pm 0,14$	$2,29 \pm 0,93$	$0,63 \pm 0,28$	$0,69 \pm 0,22$
<b>M</b>	$1,04 \pm 0,26$	$0,99 \pm 0,11$	$2,39 \pm 0,02$	$2,38 \pm 0,16$	$0,59 \pm 0,08$	$0,48 \pm 0,05$
<b>F</b>	$0,95 \pm 0,79$	$1,38 \pm 0,62$	$2,12 \pm 0,09$	$2,19 \pm 0,88$	$0,63 \pm 0,07$	$0,69 \pm 0,18$
<b>S</b>	$1,17 \pm 0,46$	$1,29 \pm 0,08$	$2,66 \pm 0,27$	$2,90 \pm 0,09$	$0,48 \pm 0,21$	$0,56 \pm 0,03$
<b>CM</b>	$1,17 \pm 0,75$	$1,05 \pm 0,90$	$2,09 \pm 0,70$	$2,37 \pm 0,10$	$0,60 \pm 0,16$	$0,32 \pm 0,09$
<b>Lalvin QA23®</b>	$1,32 \pm 0,35$	$1,48 \pm 0,37$	$2,33 \pm 0,34$	$2,39 \pm 0,84$	$0,45 \pm 0,26$	$0,53 \pm 0,16$

O ácido tartárico é dificilmente encontrado nas diferentes espécies vegetais, sendo a videira uma das poucas plantas onde ele está presente em quantidade elevada. É o ácido mais importante dos ácidos fixos do vinho e representa 1/3 ou 1/4 do total. É um ácido forte que interfere diretamente no pH do vinho. Na fase de maturação do bago é de esperar encontrar valores de concentração entre 6,0 g L<sup>-1</sup> e 9,0 g L<sup>-1</sup> (Magalhães, 2008). Quando presente em elevadas concentrações, confere aspereza e mesmo certa adstringência ao vinho; mas, em concentrações adequadas é responsável pela fineza ácida dos bons produtos.

Inicialmente o mosto apresentou uma concentração de ácido tartárico de  $(1,06 \pm 0,13)$  g L<sup>-1</sup>, apresentando teor muito inferior aos referidos na bibliografia (Genisheva *et al.*, 2014; Magalhães, 2008). Esta discrepância de valores pode ser justificada tendo em conta as propriedades químicas do ácido. Uma vez que as amostras foram congeladas e posteriormente analisadas, o estado do ácido tartárico foi alterado pela congelação, precipitando e tornando-se, posteriormente incapaz de se voltar a dissolver (Andrade, 2012).

O ácido málico é um dos ácidos orgânicos mais difundidos na natureza, predominando em grande número de vegetais. É considerado um ácido fraco e pouco resistente à respiração oxidativa. O teor habitual de ácido málico encontrado no bago da uva varia entre 0,7 g L<sup>-1</sup> a 2,7 g L<sup>-1</sup> (Magalhães, 2008). No entanto, a sua concentração pode sofrer diminuição significativa se for metabolizado por bactérias lácticas aquando da fermentação malolática (FML).

Os valores encontrados foram, no seu geral, superiores a 2 g L<sup>-1</sup> e bastante próximos do encontrado inicialmente no mosto  $(2,44 \pm 0,22)$  g L<sup>-1</sup> bem como dos valores citados por Magalhães (2008). No entanto Navarre (1997) alega que a concentração de ácido málico esperada no vinho será entre 0 g L<sup>-1</sup> e 1 g L<sup>-1</sup>. Este acontecimento pode ser justificado pela não ocorrência da FML. Durante a FML, ocorre a descarboxilação do ácido málico em ácido láctico, com produção de CO<sub>2</sub>, fazendo com que o ácido málico diminua a sua concentração, podendo até desaparecer por completo.

O ácido cítrico do vinho provém das uvas, é um ácido orgânico forte, normalmente presente em pequenas quantidades nos mostos e geralmente ausente nos vinhos.

Na sua generalidade as concentrações de ácido cítrico encontradas (Tabela III.4), sofreram um aumento em relação à concentração inicial encontrada no mosto  $(0,33 \pm 0,07)$  g L<sup>-1</sup>. Tal facto era espectável, uma vez que é usual a concentração deste ácido composto sofrer um ligeiro aumento durante a FA, sendo posteriormente consumido durante a FML (Malherbe *et al.*, 2012).

Aquando da interrupção da FA (Caso 1), destaca-se o valor obtido para o ácido cítrico pela estirpe Lalvin QA23®  $(0,45 \pm 0,26)$  g L<sup>-1</sup>, como sendo o menor encontrado. Já no Caso 2, destacou-se a estirpe CM com um valor de  $(0,32 \pm 0,09)$  g L<sup>-1</sup>.

Todas concentrações de ácido cítrico (independentemente da estirpe e do caso em estudo) se encontram abaixo de 1 g L<sup>-1</sup> (valor proposto), atingindo um máximo de

0,69 g L<sup>-1</sup> pelas estirpes BE e F (Caso 2). Assim, verifica-se o cumprimento do valor limite proposto internacionalmente pela OIV e pela UE.

### Ácido acético

A acidez volátil é constituída por cerca de 96 % do ácido acético e, por isso, é usual associar-se termo acidez volátil apenas ao ácido acético. O ácido acético pode ser formado em qualquer momento da produção de vinho. Com efeito, pode ser produzido antes da FA por deterioração microbiana das uvas infetadas por *Botrytis cinerea*. Também pode ser formado pelas leveduras durante a FA e, mais tarde, pelas bactérias do ácido láctico durante a FML (Vilela-Moura *et al.*, 2011).

A Tabela III.5 apresenta as concentrações de ácido acético determinadas por HPLC.

Tabela III.5 Concentrações de ácido acético ( $C_{Acético}$ ) determinados por HPLC, nos vinhos produzidos à escala piloto, e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

	$C_{Acético}/(g\ L^{-1})$	
	<b>Caso 1</b>	<b>Caso 2</b>
<b>BE</b>	0,63 ± 0,48	0,64 ± 0,38
<b>M</b>	0,49 ± 0,54	0,67
<b>F</b>	0,47 ± 1,21	0,53 ± 0,79
<b>S</b>	0,33 ± 0,44	0,53 ± 0,39
<b>CM</b>	0,43 ± 1,11	0,61 ± 1,11
<b>Lalvin QA23®</b>	0,29 ± 0,17	0,59 ± 0,14

Pela análise da Tabela III.5, pode-se constatar que o máximo de ácido acético alcançado foi 0,67 g L<sup>-1</sup>, pela estirpe M (Caso 2). No entanto este resultado é desprovido de erro associado, uma vez que no duplicado da amostra o ácido em causa não foi detetado via HPLC, pondo em dúvida a veracidade do valor. Paralelamente, foram encontrados erros associados consideráveis às demais concentrações descobertas. Em alguns dos casos, o erro associado ultrapassou o valor do parâmetro em causa. Tal facto pode ser justificado pela dificuldade sentida em identificar o pico cromatográfico, uma vez que há bastantes compostos com tempo de retenção próximos do ácido acético.

Segundo o Regulamento (CE) n.º 606/2009, o limite legal de acidez volátil, expressa em ácido acético, para vinhos brancos é 1,08 g L<sup>-1</sup>. Visto que, na sua globalidade, os valores foram inferiores ao limite legal exigido, pode-se excluir a hipótese de contaminação.

### Acidez total e pH

A acidez total (*AT*) do vinho é basicamente formada pelos ácidos tartárico, málico, cítrico, láctico e o succínico, sendo que mais de 90 % é composta apenas pelos ácidos tartárico e málico. A *AT* desempenha um importante papel nas características organolépticas do vinho. A acidez reforça e conserva os aromas, e dá corpo e frescura ao vinho no seu envelhecimento. A *AT* de um vinho deve estar compreendida entre 5,5 g L<sup>-1</sup> e 8,5 g L<sup>-1</sup> (expressa em ácido tartárico) em que os vinhos brancos deveriam estar mais próximos do limite superior e os tintos do limite inferior (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006; Jackson, 2008). Por outro lado, os vinhos com DO *Vinho Verde* deverão ter um limite mínimo de *AT* igual ou superior a 4,5 g L<sup>-1</sup> (Portaria n.º 668/2010).

O conhecimento do valor de pH do vinho é de elevada importância visto que, por ele, pode avaliar-se a resistência do vinho à infecção bacteriana ou tendência para contrair casse férrica, ou a percentagem de SO<sub>2</sub> presente na forma elementar. O valor de pH, que é exatamente o logaritmo da concentração em iões H<sup>+</sup>, apresenta valores de 3 a 4 (Guerra, 1998). No entanto, é de ressaltar que quanto mais baixo for o valor, maior proteção é conferida ao vinho, possuindo maior resistência a infecções bacterianas devido ao meio ácido. Mais especificamente, nos vinhos brancos é habitual encontrar valores entre 3,1 e 3,4 (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Na Tabela III.6 são apresentados os valores de *AT* e de pH determinados por FTIR.

Tabela III.6 Concentrações de acidez total (*AT*) e valores de pH determinados por FTIR, nos vinhos produzidos à escala piloto, e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

	<i>AT</i> /(g L <sup>-1</sup> )		pH	
	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2
<b>BE</b>	7,35 ± 0,05	7,65 ± 0,15	3,29 ± 0,13	3,36 ± 0,09
<b>M</b>	6,90 ± 0,02	6,55 ± 0,55	3,26 ± 0,04	3,62 ± 0,79
<b>F</b>	7,10 ± 0,10	7,15 ± 0,25	3,31 ± 0,01	3,35 ± 0,02
<b>S</b>	7,15 ± 0,05	7,10	3,27 ± 0,01	3,32
<b>CM</b>	7,00	6,30	3,30	3,37
<b>Lalvin QA23®</b>	6,80 ± 0,01	6,75 ± 0,25	3,36 ± 0,09	3,41 ± 0,02

No que diz respeito à *AT* (expressa em ácido tartárico), foram encontrados valores compreendidos entre 6,5 g L<sup>-1</sup> e 7,5 g L<sup>-1</sup>, encontrando-se entre o espectável mencionado por Ribereau-Gayon *et al.* (2006) e Jackson (2008). Paralelamente, os valores de *AT* encontrados nos diferentes vinhos produzidos respeitam o limite mínimo legislado de *AT*

dos *Vinhos Verdes*. Por outro lado, o facto de o ácido tartárico (em conjunto com o ácido málico) corresponder a cerca de 90 % da AT, e este ter sido encontrado em tão baixas concentrações, leva a suspeitar que o valor da AT seja superior ao valor descoberto.

Em relação ao pH, no Caso 1 (Tabela III.6) os valores variaram entre 3,26 e 3,3; por seu lado no Caso 2 alteraram entre 3,32 e 3,41. Verifica-se que os valores, independentemente da vertente em estudo, encontram-se bastante próximos dos valores citados por Ribéreau-Gayon *et al.* (2006). Não se considera essencial, relevar qual das estirpes atingiu um pH superior uma vez que todos eles apresentam extrema proximidade. Salienta-se apenas o erro associado ao valor de pH encontrado no vinho produzido pela estirpe M ( $3,62 \pm 0,79$  – Caso 2), não sustentando o valor encontrado para o parâmetro em causa. Por outro lado, uma vez que o ácido tartárico influencia diretamente o valor de pH, será de prever um meio mais ácido.

#### 15.2.2 Compostos voláteis do aroma - maioritários

Durante a FA, para além do etanol são também originados outros produtos, como por exemplo os álcoois superiores (Gutierrez, 1993).

A produção de álcoois superiores está associada à presença de oxigénio, às temperaturas elevadas, à presença de partículas em suspensão no mosto, à atividade metabólica de leveduras e bactérias (Jackson, 2008). Os álcoois superiores quantificados por GC-FID, nos vinhos produzidos neste projeto foram o 1-propanol, o 2-metil-1-propanol, o 2-metil-1-butanol, o 3-metil-1-butanol e o 2-feniletanol. Pelo mesmo método, quantificou-se também o acetaldeído, o acetato de etilo e o metanol.

Nas Tabelas III.7 e III.8 são apresentados os resultados obtidos referente à produção de acetaldeído, de acetato de etilo, de metanol e de álcoois superiores à escala piloto no Caso 1 e Caso 2, respetivamente.

De uma forma muito geral, pode-se concluir de imediato que as concentrações no Caso 2 foram ligeiramente superiores em relação ao Caso 1. Tal facto era espectável uma vez que a produção destes compostos acompanha a FA. Como tal, ao interromper forçadamente a FA (Caso 1) interrompeu-se igualmente a formação de álcoois superiores e os demais compostos do aroma.

Tabela III.7 Concentrações (C) de acetaldeído, acetato de etilo, metanol e álcoois superiores determinados por GC-FID, nos vinhos produzidos à escala piloto (Caso 1), e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

Caso 1		C/(mg L <sup>-1</sup> )	BE	M	F	S	CM	Lalvin QA23®
		acetaldeído	9,2 ± 1,1	-	6,8 ± 2,9	6,4	6,6 ± 1,7	9,5 ± 3,9
		acetato de etilo	27,0 ± 8,5	28,8	29,8 ± 1,8	34,8 ± 1,3	31,4 ± 14,4	37,4 ± 4,0
	Álcoois superiores	metanol	61,6 ± 8,2	102,8	111,5 ± 7,7	95,5 ± 14,4	122,7 ± 19,7	122,1 ± 31,5
		1-propanol	20,1 ± 1,1	27,2	25,3 ± 7,1	31,6 ± 8,5	28,2 ± 7,6	29,6 ± 2,3
		2-metil-1-propanol	54,1 ± 1,9	31,6	38,8 ± 2,5	38,7 ± 9,2	43,6 ± 7,9	38,2 ± 13,2
		2-metil-1-butanol	33,5 ± 3,5	22,4	21,3 ± 4,4	26,0 ± 4,8	22,0 ± 5,1	26,0 ± 7,7
		3-metil-1-butanol	134,4 ± 11,2	120,5	109,9 ± 6,4	136,6 ± 6,1	126,3 ± 11,8	142,9 ± 11,0
		2-feniletanol	31,7 ± 6,3	20,9	19,1 ± 1,6	24,2 ± 7,1	19,4 ± 4,5	25,6 ± 4,4
<b>TOTAL</b>	273,7	222,5	214,4	257,2	239,5	262,2		

Tabela III.8 Concentrações (C) de acetaldeído, acetato de etilo, metanol e álcoois superiores determinados por GC-FID, nos vinhos produzidos à escala piloto (Caso 2), e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

Caso 2		C/(mg L <sup>-1</sup> )	BE	M	F	S	CM	Lalvin QA23®
		acetaldeído	13,1	16,1 ± 8,6	8,3 ± 3,7	11,3 ± 5,3	10,6 ± 5,9	9,9 ± 7,7
		acetato de etilo	35,1	41,2 ± 2,7	38,1 ± 3,8	38,1 ± 6,6	38,5 ± 4,0	44,6 ± 6,6
	Álcoois superiores	metanol	109,4	119,0 ± 29,6	136,5 ± 16,2	111,6 ± 8,0	120,9 ± 60,4	160,6 ± 30,7
		1-propanol	22,4	30,6 ± 6,6	24,9 ± 38,1	33,9 ± 6,9	32,8 ± 1,0	34,0 ± 2,5
		2-metil-1-propanol	57,6	50,2 ± 11,4	53,3 ± 14,6	47,3 ± 1,2	39,8 ± 5,8	39,2 ± 4,1
		2-metil-1-butanol	35,8	28,5 ± 8,6	24,3 ± 2,0	30,6 ± 1,7	30,0 ± 2,2	28,8 ± 5,6
		3-metil-1-butanol	144,4	153,6 ± 39,7	141,3 ± 13,8	171,5 ± 25,3	168,1 ± 15,1	150,4 ± 16,4
		2-feniletanol	42,7	23,8 ± 5,2	25,1 ± 3,3	25,1 ± 2,3	25,9 ± 9,2	28,1 ± 19,0
<b>TOTAL</b>	302,8	286,6	268,9	308,3	296,6	280,4		

O acetaldeído (ou etanal) é altamente volátil e possui um odor irritante mas em baixas concentrações confere um aroma fresco a folhas verdes (Czerny *et al.*, 2008; Meilgaard, 1975). O seu limite percepção olfativa (LPO) encontra-se entre 0,5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup> (Moreno *et al.*, 2005). Considerando o limite mínimo do limiar de percepção verifica-se que todas as estirpes em estudo ultrapassaram o valor. No entanto se se considerar o limite máximo do limiar, apenas as estirpes BE, M e S (Caso 2) produziram concentrações mais elevadas. No entanto considera-se que, independentemente do limite em estudo, as concentrações encontradas não foram de todo abusivas conferindo de uma forma geral um aroma fresco a todos os vinhos produzidos.

O LPO do acetato de etilo é 12,3 mg L<sup>-1</sup>. Em elevadas concentrações, este composto produz aroma desagradável, considerando-se um defeito a nível sensorial (Escudero *et al.*, 2004). Independentemente do caso e da estirpe em estudo, as concentrações encontradas foram superiores ao dobro do referido limite, ressaltando as estirpes M e Lalvin QA23<sup>®</sup> (Caso 2), com concentrações (41,2 ± 2,7) mg L<sup>-1</sup> e (44,6 ± 6,6) mg L<sup>-1</sup>, respetivamente. No entanto, considera-se que apenas para concentrações superiores a 100 mg L<sup>-1</sup> é que o aroma característico deste composto não é bem aceite (Bayonove *et al.*, 1998). Assim, indica-se que a nível sensorial (exame olfativo) nenhum dos vinhos apresentou o aroma típico a “cola solvente”.

O metanol é um composto volátil incolor, com um odor a álcool moderado (Cortés *et al.*, 2011). Este composto é tóxico, tendo mostrado exercer efeitos adversos na saúde humana, tais como dor de cabeça, fadiga, náuseas, deficiência visual ou cegueira completa, convulsões, colapsos circulatórios, falha respiratória e até mesmo morte. As concentrações encontradas deste composto foram bastante próximas, independentemente da estirpe em estudo, variando entre 109,4 mg L<sup>-1</sup> e 160,6 mg L<sup>-1</sup> (Caso 2), para as estirpes BE e Lalvin QA23<sup>®</sup>, respetivamente. Verificou-se que em nenhum dos vinhos produzidos, o metanol apresentou valores de concentração superiores à concentração máxima fixada em 250 mg L<sup>-1</sup>, aconselhada pela OIV (Código Internacional de Práticas Enológicas - 2014).

A concentração dos álcoois superiores em vinhos de regiões de clima temperado varia entre 140 mg L<sup>-1</sup> e 420 mg L<sup>-1</sup> (Boulton *et al.*, 1996). No entanto, quando presentes em concentrações acima de 300 mg L<sup>-1</sup>, estes compostos voláteis podem proporcionar

impacto negativo sobre a qualidade sensorial do vinho (Rapp e Mandery, 1986). Assim, no que diz respeito aos álcoois superiores avaliados nos vinhos produzidos, apresentam uma concentração total próxima de 300 mg L<sup>-1</sup>, e nalguns casos ligeiramente inferior. Apenas nas estirpes BE e S foram encontrados valores totais de 302,8 mg L<sup>-1</sup> e 308,27 mg L<sup>-1</sup>, respetivamente. No entanto considera-se a aproximação a 300 mg L<sup>-1</sup>, não levando suspeitas acerca de um possível impacto negativo a nível sensorial.

Em relação aos álcoois superiores, optou-se por apenas analisar o Caso 2, uma vez que as discrepâncias de concentrações são pouco relativas tendo em conta o Caso em estudo. Foi calculado o parâmetro de valor de atividade olfativa (VAO), tendo em conta a razão entre a concentração encontrada e o LPO de cada composto. Sendo que quando este parâmetro toma valores superiores a 1 indica que o composto contribui para o aroma do produto, em contrapartida quando toma valores inferiores a 1 aponta que pouco ou nada influencia o aroma final (Guth, 1997).

Na Tabela III.9 são apresentados os valores calculados de VAO, tendo em conta a concentração encontrada do composto e o LPO do mesmo.

Tabela III.9 Limiar de percepção olfativo (LPO) e valores de atividade olfativa (VAO) para os nos vinhos produzidos à escala piloto – Caso 2

	LPO/(mg L <sup>-1</sup> )	VAO						
		BE	M	F	S	CM	Lalvin QA23®	
acetaldeído <sup>1</sup>	10	1,3	1,6	0,8	1,1	1,0	1,0	
acetato de etilo <sup>2</sup>	12,3	2,9	3,4	3,1	3,1	3,0	3,6	
metanol <sup>1</sup>	668	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
1-propanol <sup>1</sup>	830	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<b>Álcoois superiores</b>	2-metil-1-propanol <sup>1</sup>	40	1,4	1,3	1,3	1,2	1,0	1,0
	3-metil-1-butanol <sup>1</sup>	30	4,8	5,1	4,7	5,7	5,6	5,0
	2-feniletanol <sup>3</sup>	14	3,1	1,7	1,8	1,8	1,9	2,0

<sup>1</sup> Moreno *et al.*, 2005; <sup>2</sup> Escudero *et al.*, 2004; <sup>3</sup> Ferreira *et al.*, 2000

Apesar de os álcoois superiores, individualmente, não contribuírem com notas agradáveis para o aroma do vinho (exceto 2-feniletanol), na sua totalidade, eles podem contribuir positivamente para o aroma global e final (Rapp e Versini, 1995; Genisheva *et al.*, 2014). O 2-feniletanol confere um aroma floral a rosas, perfumado e adocicado (Culleré *et al.*, 2004; Escudero *et al.*, 2004). Este componente apresentou VAO > 1 independentemente da estirpe em estudo. No entanto, evidenciou-se aquando do uso da

estirpe BE apresentando um valor de  $VAO=3,0$ . Por sua vez, o 2-metil-1-propanol e o 3-metil-1-butanol apresentam os seguintes descritores de aroma: álcool, amargo e maltado (Culleré *et al.*, 2008; Czerny *et al.*, 2008; Meilgaard, 1975) e banana, adocicado (Meilgaard, 1975), respetivamente. Ambos apresentaram valores de  $VAO > 1$ , destacando-se o composto 3-metil-1-butanol com valores próximos de 5 em todas as estirpes em estudo. No que diz respeito ao 1-propanol, foram encontrados valores de  $VAO < 1$  para todas as estirpes, indicando que não contribuiu para o aroma final do vinho produzido.

#### 15.2.3 Compostos voláteis do aroma - minoritários

As concentrações dos compostos voláteis minoritários dos vinhos encontram-se na Tabela III.10. Foram identificados e quantificados um total de 56 compostos, estes foram classificados por grupos, dos quais (5) óxidos monoterpénicos, (2) norisoprenóides em  $C_{13}$ , 5 compostos em  $C_6$ , (6) álcoois monoterpénicos, (4) ésteres de ácidos fixos, (4) ésteres de ácidos gordos, (2) compostos carbonilados, (5) acetatos de álcoois superiores, 8 ácidos gordos voláteis, (8) álcoois, (5) fenóis voláteis e, (3) diversos. Esta classificação teve em conta a estrutura química dos compostos voláteis, e as vias que conduzem à sua formação (Oliveira *et al.*, 2008).

Os álcoois monoterpénicos foram encontrados em concentrações bastante similares em todos os vinhos produzidos. Isto é explicado pelo facto que todas estirpes foram testadas no mesmo tipo de mosto e estes compostos fazem parte do aroma varietal das uvas (Genisheva e Oliveira, 2009; Oliveira *et al.*, 2008). No entanto, nenhum dos compostos encontrados ultrapassou o respetivo  $LPO$  demonstrando, considerando-se assim que estes compostos não contribuíram para o aroma final de cada vinho. Apenas o linalol apresenta um  $VAO$  próximo da unidade, não ultrapassando, no entanto, valor 1. O seu descritor do aroma é floral lembrando a lavanda (Vilanova e Oliveira, 2012).

Os óxidos de linalol são bastante menos odoríferos que o linalol (Oliveira e Vilanova, 2012), apresentando um  $LPO$  na ordem dos  $mg L^{-1}$ , mais especificamente entre  $3 mg L^{-1}$  e  $6 mg L^{-1}$ . As estirpes S, CM e Lalvin QA23<sup>®</sup> destacaram-se pela produção destes óxidos.

### III – Resultados e Discussão

Tabela III.10 Concentração (C) e limiar de percepção olfativa (LPO) dos compostos voláteis minoritários do aroma, nos vinhos produzidos à escala piloto – Caso 2

	C/( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LPO/ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	BE	M	F	S	CM	Lalvin QA23®
<b>Álcoois monoterpênicos</b>	linalol <sup>1</sup>	25	16,8	18,4	15,4	7,9	18,1	12,7
	HO-trienol <sup>2</sup>	110	12,5	15,7	11,1	5,1	13,4	8,7
	$\alpha$ -terpineol <sup>1</sup>	250	32,6	17,5	20,8	25,3	42,8	40,3
	citronelol <sup>3</sup>	100	9,9	3,5	4,7	1,2	5,2	2,9
	nerol <sup>4</sup>	400	1,2	0,5	0,5	0,2	0,4	0,8
	geraniol <sup>5</sup>	36	n.d.	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Óxidos monoterpênicos</b>	óxido furânico de linalol, <i>trans</i> -		1,0	0,4	0,5	0,97	1,3	1,5
	óxido furânico de linalol, <i>cis</i> -		4,7	n.d.	2,7	0,2	5,3	n.d.
	óxido pirânico de linalol, <i>trans</i> -		n.d.	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	óxido pirânico de linalol, <i>cis</i> -		0,3	1,4	n.d.	0,0	3,3	1,3
	óxido furânico de linalol, <i>trans</i> -		1,0	0,4	0,5	0,97	1,3	1,5
<b>Norisoprenóides em C<sub>13</sub></b>	$\beta$ -damascenona <sup>6</sup>	0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,06	n.d.
	3-oxo- $\alpha$ -ionol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,20	n.d.
<b>Compostos C<sub>6</sub></b>	1-hexanol <sup>7</sup>	8000	237,0	243,7	168,1	84,3	161,6	153,2
	( <i>Z</i> )-3-hexen-1-ol <sup>7</sup>	400	18,7	19,8	16,5	7,8	14,5	10,2
	( <i>E</i> )-3-hexen-1-ol		12,9	13,8	10,7	5,3	9,0	6,6
	( <i>E</i> )-2-Hexan-1-ol		n.d.	2,0	1,3	n.d.	1,4	1,2
	( <i>Z</i> )-2-Hexan-1-ol		1,7	1,0	0,7	0,1	0,7	0,6
<b>Ésteres etílicos de ácidos gordos</b>	butirato de etilo <sup>6</sup>	20	133,8	115,0	85,3	72,5	149,4	142,5
	hexanoato de etilo <sup>1</sup>	14	433,9	292,0	371,5	287,9	885,0	629,3
	octanoato de etilo <sup>1</sup>	5	643,6	397,3	561,5	654,3	1578,46	1493,1
	decanoato de etilo <sup>1</sup>	200	85,2	95,9	69,6	67,7	223,0	269,7
<b>Ésteres de ácidos fixos</b>	piruvato de etilo		0,0	0,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	lactato de etilo <sup>7</sup>	154000	52,2	40,3	28,2	19,2	24,1	19,9
	malato de dietilo		3,9	0,4	0,2	7,0	0,1	0,1
	succinato de monoetilo		n.d.	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
<b>Compostos carbonilados</b>	2-nonanona		3,4	2,5	1,7	n.d.	6,2	1,0
	benzaldeído		0,6	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1

<sup>1</sup> Ferreira *et al.*, 2000; <sup>2</sup> Simpson, 1979;

n.d. (não detetado)

<sup>3</sup> Moreno *et al.*, 2005; <sup>4</sup> Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006;

<sup>5</sup> Escudero *et al.*, 2004; <sup>6</sup> Guth, 1997;

<sup>7</sup> Vilanova *et al.*, 2010; <sup>8</sup> Chaves *et al.*, 2007

<sup>9</sup> Boidron *et al.*, 1988.

### III – Resultados e Discussão

Tabela III.10 Concentração (C) e limiar de percepção olfativa (LPO) dos compostos voláteis minoritários do aroma, nos vinhos produzidos à escala piloto – Caso 2 (continuação)

	C/( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LPO/ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>1</sup>	BE	M	F	S	CM	Lalvin QA23®
<b>Acetatos de álcoois superiores</b>	acetato de isobutilo		51,3	48,6	72,5	18,8	75,7	42,6
	acetato de isoamilo <sup>3</sup>	30	1216,9	1041,9	1345,8	584,8	1830,3	1261,3
	acetato de hexilo <sup>8</sup>	1000	122,9	144,8	170,1	64,3	204,2	167,5
	acetato (Z)-3-hexenilo		5,3	6,1	8,9	3,1	10,3	3,6
	acetato de 2-feniletilo <sup>3</sup>	250	193,9	148,3	217,6	75,4	245,3	189,6
<b>Ácidos gordos voláteis</b>	ácido isobutírico		13,0	4,8	3,1	5,6	5,1	2,9
	ácido butanoico <sup>1</sup>	173	17,9	16,1	7,5	7,3	14,6	5,0
	ácido isovalérico		5,9	10,0	10,4	4,1	7,32	9,7
	ácido hexanóico <sup>1</sup>	420	205,0	310,0	306,4	209,9	462,4	546,4
	ácido E-(2)-hexanóico		0,14	0,05	0,02	0,1	0,2	0,07
	ácido octanóico <sup>1</sup>	500	1094,9	1526,9	958,5	614,1	1740,2	1906,6
	ácido decanóico <sup>1</sup>	1000	127,9	37,2	53,7	19,1	40,5	43,6
ácido dodecanóico <sup>1</sup>	6100	0,2	0,7	0,8	0,3	0,7	0,3	
<b>Álcoois</b>	1-butanol	150	0,1	3,8	0,6	0,1	3,7	1,4
	1-pentanol		0,24	0,08	n.d.	n.d.	n.d.	0,04
	4-metil-1-pentanol		0,99	0,07	0,51	0,01	0,04	2,63
	3-metil-1-pentanol		4,82	4,12	5,01	1,16	1,90	2,79
	1-heptanol		n.d.	13,04	21,31	11,87	19,87	23,23
	3-metil-1-propanol (metionol) <sup>7</sup>	500	45,82	43,49	29,57	7,63	24,19	15,77
	álcool benzílico		5,08	6,72	5,08	3,86	4,33	2,66
tirosol		7,00	1,87	8,88	3,68	3,18	5,15	
<b>Fenóis voláteis</b>	4-vinilguaiacol <sup>9</sup>	130	122,1	111,2	124,4	7,0	164,1	139,8
	4-vinilfenol <sup>9</sup>	180	106,5	111,8	91,3	11,1	112,7	106,5
	vanilato de metilo		n.d.	0,2	n.d.	n.d.	0,4	0,7
	álcool 3,4,5-trimetoxibenzílico		2,1	2,1	0,8	1,5	0,2	0,9
	acetovanilona		2,5	4,0	0,6	7,1	8,8	0,7
<b>Outros</b>	2-metiltetrahidrotiofeno-3-ona		78,4	30,8	11,7	3,9	62,6	10,3
	pantolactona		0,3	0,2	0,1	n.d.	1,45	n.d.
	N-(2-fenil)acetamida		44,5	50,6	96,5	19,0	14,0	42,4

<sup>1</sup> Ferreira *et al.*, 2000; <sup>2</sup> Simpson, 1979;

n.d. (não detetado)

<sup>3</sup> Moreno *et al.*, 2005; <sup>4</sup> Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006;

<sup>5</sup> Escudero *et al.*, 2004; <sup>6</sup> Guth, 1997;

<sup>7</sup> Vilanova *et al.*, 2010; <sup>8</sup> Chaves *et al.*, 2007

<sup>9</sup> Boidron *et al.*, 1988.

Os ésteres etílicos de ácidos gordos, o butirato de etilo, o hexanoato de etilo e essencialmente o octanoato de etilo foram encontrados em concentrações consideravelmente superiores ao seu *LPO* em todos os vinhos produzidos com diferentes estirpes. O decanoato de etilo apenas ultrapassou o *LPO* utilizando as estirpes CM e Lalvin QA23<sup>®</sup>, apresentando valores de *OAV*=1,09 e *OAV*=1,37, respetivamente. Estes quatro ésteres de ácidos gordos conferem aroma frutado (maçã e papaia) e concedem notas adocicadas aos vinhos (Escudero *et al.*, 2004; Meilgaard, 1975).

Por outro lado o acetato de isoamilo (acetato de álcool superior) oferece um aroma frutado, a banana e apresenta um *LPO* de 30 µg L<sup>-1</sup> (Escudero *et al.*, 2004). Todas as estirpes originaram vinhos com *LPO* acima, sendo que a estirpe CM foi a que mais se evidenciou.

Os fenóis voláteis, 4-vinilguaiacol e 4-vinifenol, são produzidos durante a FA pela capacidade da *S. cerevisiae* descarboxilar ácidos hidroxicinâmicos (Chatonnet, 1993). Para concentrações acima do *LPO*, são considerados defeitos sensoriais do vinho, normalmente por ação de leveduras de contaminação (Carvalheira, 2011). Nenhum dos compostos apresentou valores de *VAO* superior à unidade, pelo que se pode afirmar que nenhuma das estirpes sofreu este tipo de contaminação. Destaca-se, porém, a estirpe S, com a menor percentagem de produção destes compostos.

A contribuição percentual de cada grupo de compostos para cada vinho, foi distinta, e está representada na Figura III.2. Os valores apresentados são fruto da soma dos componentes referentes de cada grupo, dividindo pela soma total dos diversos compostos encontrados no vinho. Assim, foi possível encontrar o peso percentual que cada grupo de compostos exerceu no aroma do produto final, consoante a estirpe em estudo.

Claramente a porção de álcoois é de maior representatividade em todos os vinhos produzidos. Independentemente da estirpe em estudo, o composto de maior concentração encontrado foi o metionol. O metionol apresenta como descritores, repolho cozido e batata (Vilanova *et al.*, 2009), porém as concentrações encontradas nos vinhos produzidos ficaram bastante aquém do *LPO* do composto. Por fim, ressalta-se que nenhum dos álcoois encontrados ultrapassou o respetivo *LPO* e conseqüentemente o seu *VAO* foi inferior à unidade, não contribuindo de forma expressiva no aroma.

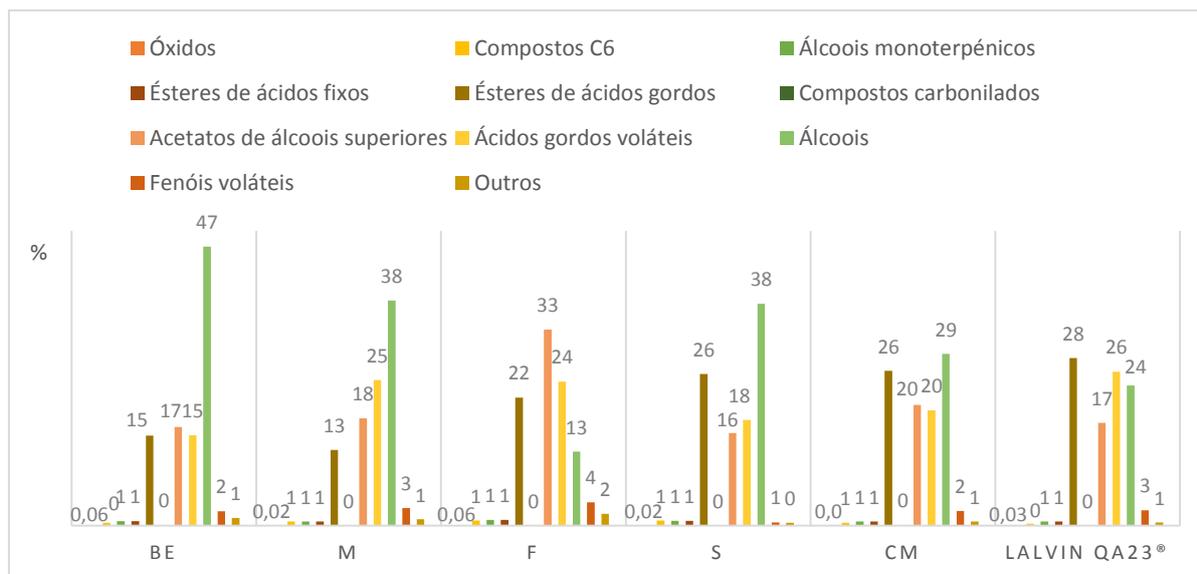


Figura III.2 – Contribuição de cada grupo de compostos voláteis minoritários encontrados nos vinhos produzidos à escala piloto.

Os ésteres apresentam odores agradáveis, frutados, e desempenham, muitas vezes, papel importante no aroma dos vinhos jovens (Dubois, 1994; Bayonove *et al.*, 1998). Em relação aos ésteres de ácidos gordos destacam-se as estirpes S, CM e Lalvin QA23®.

Os acetatos de álcoois superiores formam-se durante a FA (aroma secundário). Representaram um dos grupos com maior peso percentual no aroma, sendo que a sua maior contribuição foi o acetato de isoamilo.

Essenciais para o equilíbrio do aroma fermentativo, os ácidos gordos voláteis possuem odores considerados negativos (Etiévant, 1991). Deste grupo de compostos, destacam-se o ácido hexanóico e o ácido octanóico pelo facto das suas concentrações serem superiores ao respetivo *LPO*. Com percentagem mais elevada destaca-se o vinho produzido pela estirpe comercial Lalvin QA23® e os vinhos produzidos pelas estirpes BE e S pela situação inversa.

Os compostos em C<sub>6</sub>, que apresentam aroma herbáceo, tiveram menor importância quantitativa para os vinhos, embora, sob o aspeto qualitativo, estes possam interferir no aroma.

### 15.3 Análise sensorial

Nas fermentações à escala piloto, optou-se por interromper a FA (deixando açúcar residual ainda presente) em uma das amostras, permitindo o seu duplicado terminar a FA até atingir valor de densidade constante.

Relembrando:

- Interrupção da FA (deixando açúcar residual) – Caso 1;
- FA até densidade constante – Caso 2.

Durante o exame organolético foram servidos 12 vinhos, sendo que os 6 primeiros a ser servidos consistiram nas amostras que completaram a FA (Caso 2) e por fim os últimos 6 – Caso 1.

#### Exame visual

No exame visual foi solicitada a avaliação de três parâmetros, a limpidez, a cor e a qualidade da cor. As escalas de avaliação variavam de 0 a 5. No que diz respeito à escala de limpidez, traduz-se da seguinte forma: 0-turvo, 1-ligeiramente turvo, 2-opalino, 3-ligeiramente opalino, 4-límpido e 5-cristalino. Em relação à cor (referente a vinhos brancos): 0-citrino descorado, 1-citrino, 2-palha aberto, 3-palha, 4-ligeiramente dourado e 5-dourado. No que diz respeito à qualidade da cor, é considerado 0 como avaliação mínima e 5 avaliação máxima. Os valores apresentados na Tabela III.11 dizem respeito à mediana dos valores avaliados pelos 10 provadores.

Tabela III.11 Exame visual dos vinhos produzidos à escala piloto

	Limpidez		Cor		Qualidade da cor	
	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2
<b>BE</b>	3	3	3	3	3	3
<b>M</b>	4	4	4	4	4	4
<b>F</b>	3	3	4	3	4	3
<b>S</b>	4	3	3	3	4	3
<b>CM</b>	3	4	3	3	3	3
<b>Lalvin QA23®</b>	3	4	3	3	3	3

As estirpes BE, M e F apresentam igual limpidez independentemente do Caso em análise. Por sua vez, a estirpe S apresentaram-se como mais agradáveis no Caso 1 e as estirpes CM, M e Lalvin QA23®, no Caso 2. No entanto, os valores variaram, de uma forma

geral, entre a escala 3 (ligeiramente opalino) e 4 (límpido). Uma vez que o vinho produzido não sofreu qualquer tratamento de estabilização ou filtração, seria de esperar que a sua limpidez não atingisse os valores máximos de avaliação. No entanto, ressalta- o comportamento da estirpe M, apresentando-se como límpida em ambos os Casos em estudo. Tal valor acaba por ser espectável, uma vez que ao longo da monitorização da FA, a estirpe M sempre apresentou características diferenciadoras em relação às demais estirpes. A sua FA realizou-se, fundamentalmente, “no fundo” do fermentador.

No que diz respeito à cor e à sua qualidade, a apreciação foi independente do Caso em estudo, variando entre a escala 3 (palha) e 4 (ligeiramente dourado). Mais uma vez, a estirpe M ressalta-se nestes parâmetros, apresentando cor ligeiramente dourada em ambos os casos. Na sua maioria das estirpes ficaram-se pela escala 3 (cor palha), típica dos *Vinhos Verdes*. No que concerne à qualidade da cor, a estirpe M volta a destacar-se. Sendo que é considerado 0 como avaliação mínima e 5 avaliação máxima. A par da estirpe M, encontram-se as estirpes F e S. Na Figura III.3 é possível visualizar os vinhos das respetivas estirpes – Caso 1.

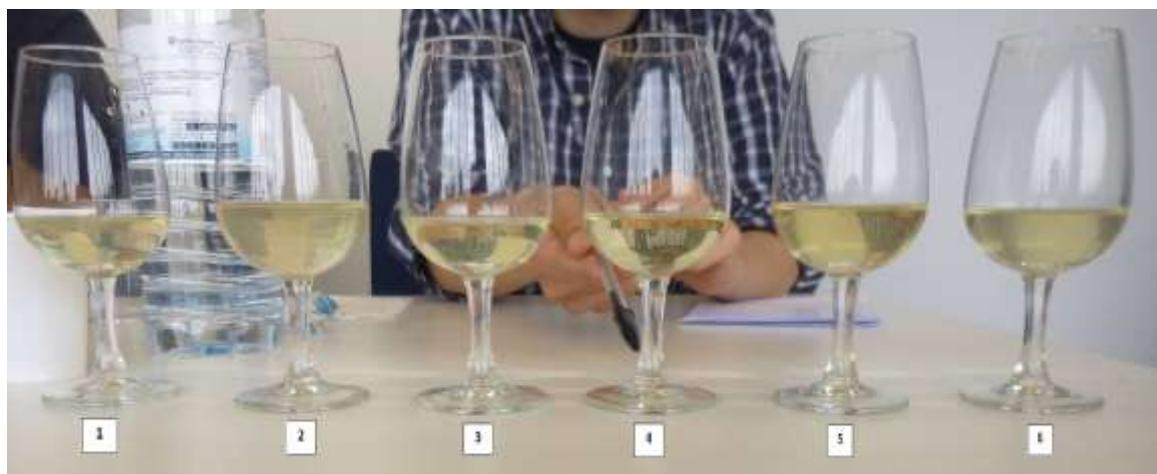


Figura III.3 – Apresentação dos vinhos durante o exame organolético  
1- Lalvin QA23®, 2- CM, 3- S, 4- F, 5- M; 6- BE.

#### Exame olfativo

No que concerne ao exame olfativo teve-se em conta dez parâmetros: intensidade, floral, fruto citrino, fruto de árvore, fruto tropical, fruto seco, especiarias, mineral, vegetal e impressão geral. Os limites (máximo e mínimo) da escala de avaliação foram os mesmos usados no exame visual. Sendo a escala de intensidade a seguinte:

0-nula, 1-muito fraca, 2-fraca, 3-média, 4-forte e 5-muito forte. Tal como foi mencionado na parte II (capítulo 14), o tratamento de resultados teve em conta a norma ISO 11035:1994.

Os perfis sensoriais dos vinhos foram construídos tendo em conta o cálculo da *MG*, estão representados na Figuras III.4.

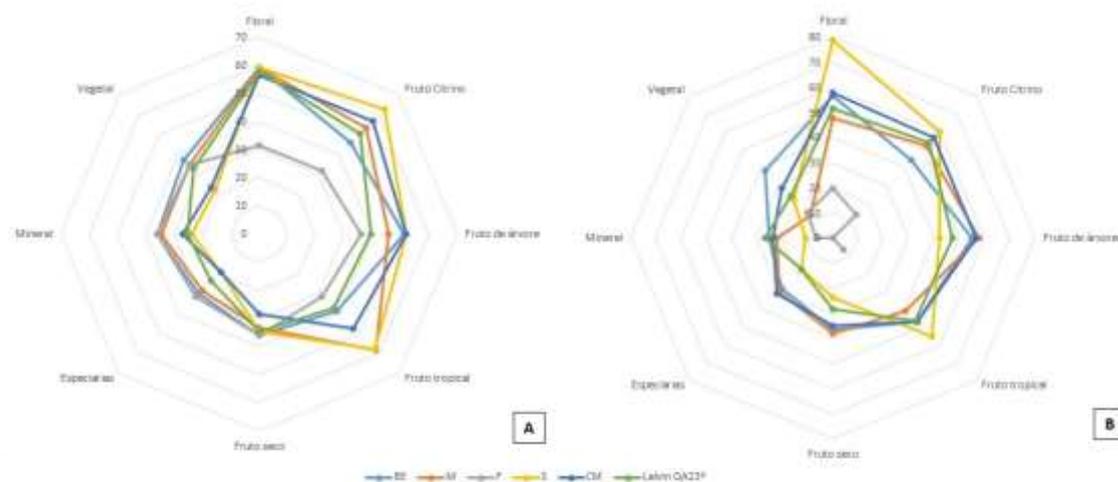


Figura III.4 - Perfil sensorial dos vinhos produzidos – (A-Caso 1, B-Caso 2).

No Caso 1, por motivos opostos, destacam-se os perfis sensoriais da estirpe F e S. A estirpe F apresenta valores muito escassos independentemente do descritor. Por sua vez a estirpe S destaca-se pelos valores apresentados em relação aos descritores floral e fruto tropical.

No entanto os valores a nível sensorial correspondentes à estirpe S não tem suporte quantitativo a nível físico-químico, afere-se que a justificação desta situação recaia na ausência de análise de outros compostos, como os tióis voláteis, por falta de condições metodológicas. Alguns dos tióis voláteis são o 4-mercaptopentano-2-ona (4MMP), o 3-mercaptopentanol e o acetato de 3-mercaptopentano, apresentando como descritores do aroma mais representativos notas de buxo e giesta, toranja e maracujá respetivamente (Tominaga *et al.*, 1996). Os tióis tem *LPO* muito baixos, sendo compostos muito importantes para o aroma dos vinhos. O 4MMP pode ser detetado a partir da concentração dos 3 ng L<sup>-1</sup> no vinho (Thibon *et al.*, 2010; Tominaga *et al.*, 1996).

À exceção da estirpe F, todas as estirpes apresentam valores próximos em relação aos descritores fruto citrino e fruto de árvores. No que diz respeito ao aroma vegetal,

mineral e especiarias, praticamente não foram detetados em qualquer uma das estirpes. Os dados obtidos são suportados pelas análises cromatográficas, uma vez que os álcoois superiores, ésteres e acetatos, contribuem para as notas frutadas do aroma.

A estirpe F apresentou um defeito sensorial, evidenciado aroma a “ovos podres”. A produção de sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S) por leveduras é um problema frequente durante a elaboração de vinhos. Este composto é um gás que produz o odor característico de “ovos podres”. O LPO do composto encontra-se entre 10 µg L<sup>-1</sup> a 80 µg L<sup>-1</sup> (Włodarczyk *et al.*, 2013). Assim, torna-se importante selecionar estirpes de *S. cerevisiae* que não produzam H<sub>2</sub>S em excesso durante a FA, e assim não formar aromas indesejáveis.

O perfil sensorial no Caso 2 mantém o mesmo padrão do Caso 1, à exceção da estirpe F. Esta estirpe no Caso 2 é capaz de revelar aroma frutado, com os descritores, fruto citrino, fruto de árvore, fruto seco e fruto tropical, destacando-se o fruto seco. No entanto, apesar de menos intenso, o defeito a nível sensorial mantém-se. Neste Caso, a estirpe M acompanhou a estirpe S, obtendo valores similares dos descritores fruto tropical e floral. A estirpe comercial Lalvin QA23<sup>®</sup> firmou, essencialmente, o seu aroma a floral e fruto citrino.

De uma forma geral, a análise sensorial revelou que o vinho produzido com a estirpe S tem um aroma frutado (fruto tropical e fruto citrino) e floral mais intenso e a estirpe CM destaca-se pelo seu aroma frutado, a fruto de árvore e fruto tropical, ambas ultrapassando os padrões demonstrados pela estirpe comercial Lalvin QA23<sup>®</sup>.

O perfil sensorial encontrado é suportado pela tipicidade aromática característica dos *Vinhos Verdes* (aroma primário). O seu aroma é geralmente frutado, delicado e de intensidade mediana a forte. O aroma frutado prende-se a frutos frescos, como banana, maçã e pera. Em alguns casos distinguem-se certas notas florais a rosas e a madressilva. As castas presentes no mosto (*Arinto, Avesso, Loureiro e Trajadura*) são também conhecidas pela atribuição de notas aromáticas frutadas (frutos citrinos) e florais (rosas).

#### Exame gustativo

No exame gustativo foram avaliados oito parâmetros, a doçura, a acidez, o calor, o amargor, a estrutura, o equilíbrio, a persistência e a impressão geral. A escala utilizada foi igual à utilizada no exame olfativo. No entanto, tal como no exame visual, os valores

expostos na Tabela III.12, dizem respeito à mediana dos valores avaliados pelos 10 provadores.

Tabela III.12 Exame gustativo dos vinhos produzidos à escala piloto

	Doçura		Acidez		Calor		Amargor	
	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2
<b>BE</b>	3	2	2	3	3	2	2	2
<b>M</b>	2	2	2	2	3	3	2	1
<b>F</b>	1	1	4	4	1	1	3	3
<b>S</b>	3	2	2	3	2	2	1	2
<b>CM</b>	4	2	2	2	2	2	2	2
<b>Lalvin QA23®</b>	2	1	3	3	3	2	2	3

No que diz respeito à doçura, evidentemente, foram encontrados valores superiores no Caso 1. Caso esse em que a cessação da FA foi forçada, deixando ainda açúcar residual presente no vinho final. Tendo em conta o Caso 2 os valores foram similares entre estirpes, atingindo um máximo de escala 2 (fraca). No entanto, no Caso 1, destaca-se a estirpe CM logo seguida das estirpes S e BE. Esta avaliação não foi de encontro com os resultados obtidos por HPLC, sendo que o vinho produzido pela estirpe CM (Caso 1) foi precisamente o que possuía menor teor de açúcar (sensivelmente  $6 \text{ g L}^{-1}$ ) e a estirpe M apresentou um máximo de açúcares próximo de  $21 \text{ g L}^{-1}$ . A nível de acidez e amargor destacou-se a estirpe F. As estirpes apresentaram valores muito semelhantes no que diz respeito à sensação de calor (exceção da estirpe F). Estas características sensoriais são suportadas pela análise cromatográfica, já que o etanol e o glicerol contribuem para o calor e corpo do vinho (Vieira, 2013).

Na Tabela III.13 são apresentadas as características estrutura, equilíbrio, persistência e impressão geral (exame gustativo) dos vinhos produzidos à escala piloto.

Tabela III.13 Exame gustativo dos vinhos produzidos à escala piloto (2)

	Estrutura		Equilíbrio		Persistência		Impressão geral	
	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2	Caso 1	Caso 2
<b>BE</b>	3	2	2	2	2	3	3	3
<b>M</b>	2	3	2	3	3	3	3	3
<b>F</b>	0	1	0	1	2	3	1	2
<b>S</b>	3	3	3	3	4	3	4	3
<b>CM</b>	3	1	3	2	3	2	3	3
<b>Lalvin QA23®</b>	3	2	2	2	3	2	3	2

A estirpe S apresenta um gosto mais persistente, equilibrado e estruturado, quando comparada com as outras estirpes em estudo, ultrapassando a estirpe comercial Lalvin QA23®. Em contrapartida, a estirpe F é que oferece menos capacidade estrutural e menor equilíbrio. No que diz respeito ao parâmetro impressão geral, denota-se que a estirpe S foi a mais apreciada ao nível do sentido gustativo, em concordância com a apreciação ao nível olfativo. Depois seguem-se as estirpes CM, M, BE e a comercial Lalvin QA23®.

#### Apreciação global

Requeru-se ao provador que avaliasse cada vinho numa escala de 0–20. A escala de intensidade variou da seguinte forma: 0–4-mau, 6–8-medíocre, 10-suficiente, 12–14-bom, 16–18-muito bom e 20-excelente. Na Tabela III.14 são mostradas as medianas das avaliações de cada vinho produzido, nos diferentes casos.

A preferência dos provadores manteve o mesmo padrão independentemente do Caso selecionado. As estirpes S e CM foram as mais apreciadas, seguidamente das estirpes M, Lalvin QA23®, BE e, por último, estirpe F.

Tabela III.14 Apreciação global dos vinhos produzidos à escala piloto, (mediana das classificações atribuídas)

	<b>Caso 1</b>	<b>Caso 2</b>
<b>BE</b>	12	9,5
<b>M</b>	12	12,5
<b>F</b>	4	8
<b>S</b>	16	13,5
<b>CM</b>	14	12,5
<b>Lalvin QA23®</b>	12	11,5

---

## 16. Caracterização dos vinhos – microescala

Como foi referido na parte II – materiais e métodos, os vinhos produzidos em microescala foram analisados a nível físico-químico. De seguida são apresentados e discutidos os resultados encontrados.

### 16.1 Monitorização da FA

Tendo em conta o decurso da FA, verificou-se a diminuição progressiva do peso de cada balão *Erlenmeyer*. O decréscimo do peso é justificado pela libertação de CO<sub>2</sub>, como resultado da degradação dos açúcares e formação de etanol, justificando assim capacidade fermentativa de todas as estirpes em estudo. Com o passar do tempo, denotou-se um aumento da turbidez do líquido (mosto em fermentação), bem como formação de um “depósito” no fundo de cada balão. O aumento da turbidez está diretamente ligado ao crescimento celular, podendo-se concluir que ocorreu multiplicação celular. Este item vem reafirmar a ocorrência da FA. Como se pode verificar na Figura III.5, facilmente se visualiza uma turbidez nas três réplicas (utilizando a mesma estirpe), originando até uma espécie de “depósito”.

Apesar de na Figura III.5 apenas constar uma das estirpes testadas, todas as estirpes foram capazes de levar a cabo FA e, como tal, apresentaram todas no final uma turbidez bastante elevada.

Um dos fatores a ter em conta na escolha da estirpe de levedura a utilizar é a rapidez com que esta consegue completar a degradação dos açúcares presentes. Dependendo da estirpe em teste, a estabilização do peso dos balões em causa demorou diferentes tempos, sendo um mínimo 17 d (estirpes M e Lalvin QA23<sup>®</sup>) máximo 24 d (estirpe S).

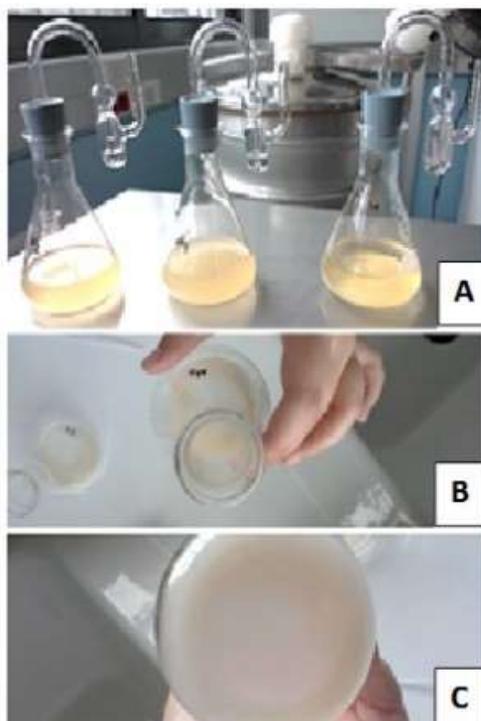


Figura III.5 Ensaio em microescala (A-turbidez nas três réplicas, B e C-“depósito” formado).

Na Tabela III.15, pode-se consultar os diferentes tempos de duração da fermentação das diferentes leveduras, tendo em conta as três réplicas.

Numa primeira análise, verifica-se que todas as réplicas de cada estirpe mantiveram o mesmo padrão de cinética, vindo a terminar em simultâneo. Como exceção, apresenta-se a réplica 1 da estirpe F, terminando 1 d antes das outras duas réplicas e a réplica 1 da estirpe CM, terminado 1 d após as outras réplicas. No entanto considera-se a diferença mínima, não levantando quaisquer questões acerca do processo metabólico.

Tabela III.15 Duração (t) da FA em microescala tendo em conta as três réplicas em estudo

	t/d		
<b>BE</b>	21	21	21
<b>M</b>	17	17	17
<b>F</b>	17	18	18
<b>S</b>	24	24	24
<b>CM</b>	19	18	18
<b>Lalvin QA23®</b>	17	17	17

É precisamente a estirpe de levedura Lalvin QA23® a mais rápida a finalizar a FA. No entanto, a estirpe M apresentou capacidade para terminar a FA aquando da estirpe comercial, mostrando assim a sua rápida cinética em microescala. Aquém do desejado ficou a estirpe S, pois demorou cerca de uma semana extra para terminar o mesmo processo. Conclui-se que mais uma vez, a estirpe comercial consegue comprovar a sua rápida cinética de fermentação. No entanto, é de salientar que em microescala as estirpes M, CM e F apresentaram-se como ótimos “adversários” face à estirpe comercial.

Comparativamente à escala piloto, a cinética de fermentação apresenta resultados bastante similares. Apesar de, claramente, a FA ser mais demorada em microescala, a sequência de finalização do processo das diferentes estirpes seguiu a mesma lógica. No entanto, a estirpe M destaca-se pela discrepância de resultados obtidos em diferentes escalas. A fermentação em microescala é capaz de estabilizar o seu peso, levando a crer o término da FA aquando da levedura comercial Lalvin QA23®, porém, a escala piloto é a última a atingir o fim da FA.

## 16.2 Análise química

### 16.2.1 Açúcares, ácidos orgânicos, glicerol, etanol, ácido acético, acidez total e pH

#### Glucose, Frutose, Glicerol e Etanol

Na Tabela III.16 apresentam-se os resultados médios (média entre as três réplicas) referentes ao teor de açúcares, glicerol e etanol.

Tabela III.16 Concentrações de glucose ( $C_{Gluc}$ ), frutose ( $C_{Frut}$ ), glicerol ( $C_{Glicerol}$ ) e etanol (TAV) determinados por HPLC, nos vinhos produzidos em microescala, e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

	$C_{Gluc}/(g\ L^{-1})$	$C_{Frut}/(g\ L^{-1})$	$C_{Glicerol}/(g\ L^{-1})$	TAV/%
<b>BE</b>	$0,38 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,04$	$3,14 \pm 0,60$	$9,76 \pm 1,03$
<b>M</b>	$0,38 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,03$	$3,20 \pm 0,81$	$9,99 \pm 1,66$
<b>F</b>	$0,39 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,09$	$3,11 \pm 0,77$	$10,06 \pm 2,39$
<b>S</b>	$0,43 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,14$	$3,02 \pm 0,58$	$9,18 \pm 2,75$
<b>CM</b>	$0,37 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,09$	$3,26 \pm 0,92$	$10,46 \pm 0,85$
<b>Lalvin QA23®</b>	$0,36 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,08$	$2,79 \pm 0,49$	$9,25 \pm 0,66$

No que diz respeito aos valores obtidos de concentração de ambas as hexoses (frutose e glucose), foram bastante similares comparativamente ao Caso 2 (FA até

densidade constante) à escala piloto. Apenas a estirpe M representa a única exceção à afirmação anterior. Sendo que, apresenta concentração de açúcares mais elevada na escala piloto do que em microescala,  $5,51 \text{ g L}^{-1}$  face a  $0,68 \text{ g L}^{-1}$ . Assim, afirma-se que a estirpe M não foi capaz de levar a cabo a FA até ao fim na escala piloto (20 L). Para esta hipótese contribui também o facto de esta ter sido a primeira estirpe (em conjunto com a Lalvin QA23®) a terminar a fermentação em microescala. No entanto, foi a última a terminar a fermentação à escala piloto (20 L). Crê-se que a estirpe poderá ter encontrado adversidades na conversão de açúcares, tendo em conta a maior escala de volume em estudo.

No que diz respeito ao teor de glicerol, ressalta também o facto de que apesar das fermentações terem ocorrido a diferentes escalas, os valores encontraram-se, sensivelmente, entre as mesmas gamas. Salienta-se apenas o caso da estirpe Lalvin QA23®, onde o vinho elaborado à escala piloto foi o que obteve um máximo de concentração de glicerol ( $4,09 \pm 1,67$ )  $\text{g L}^{-1}$ . No entanto, em microescala, as leveduras foram menos capazes de produzir este composto ( $2,79 \pm 0,49$ )  $\text{g L}^{-1}$ . A discrepância entre os valores é suportada pela diferença também encontrada no parâmetro TAV. Sendo que, a produção de glicerol é implícita à produção de etanol. No que concerne ao TAV, obtido pela concentração em etanol, os valores foram sensivelmente mais baixos do que os obtidos à escala piloto. A estirpe S segue a mesma linha de comportamento, em ambas as escalas, tendo sido a que atingiu menor TAV. À escala de 20 L a estirpe mais apta a produzir etanol foi a F, mas à escala de 50 mL foi a estirpe CM seguidamente da F.

#### Ácidos orgânicos

No que diz respeito aos ácidos orgânicos, a diferença de escalas de estudo também não afetou, de forma notória, os resultados. Na Tabela III.17 são apresentados os valores de concentração encontrados para o ácido tartárico, ácido málico e, ácido cítrico.

O ácido tartárico foi incapaz de se dissolver após congelamento, como tal, os resultados obtidos em microescala foram também descartados. Por sua vez o ácido málico apresenta valores muito similares, *i.e.*, na mesma gama. Tal era espectável uma vez que, em microescala também não ocorreu a FML e como tal o ácido málico não sofreu descarboxilação, não sendo convertido em ácido láctico.

Tabela III.17 Concentrações de ácido tartárico ( $C_{Tart}$ ), ácido málico ( $C_{Mál}$ ) e ácido cítrico ( $C_{Cítrico}$ ) determinadas por HPLC, nos vinhos produzidos em microescala, e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

	$C_{Tart}/(g L^{-1})$	$C_{Mál}/(g L^{-1})$	$C_{Cítrico}/(g L^{-1})$
<b>BE</b>	$0,73 \pm 0,14$	$2,23 \pm 0,13$	$0,54 \pm 0,11$
<b>M</b>	$0,93 \pm 0,26$	$2,18 \pm 0,18$	$0,62 \pm 0,06$
<b>F</b>	$0,92 \pm 0,22$	$2,40 \pm 0,17$	$0,78 \pm 0,09$
<b>S</b>	$1,22 \pm 0,04$	$2,48 \pm 0,12$	$0,59 \pm 0,08$
<b>CM</b>	$1,19 \pm 0,24$	$2,49 \pm 0,13$	$0,64 \pm 0,14$
<b>Lalvin QA23®</b>	$1,03 \pm 0,08$	$2,86 \pm 0,14$	$0,58 \pm 0,14$

As concentrações de ácido cítrico sofreram ligeiras alterações, avaliando-se como superiores a microescala. A estirpe F atingiu os valores mais elevados deste ácido, em ambas as escalas. Contrariamente, a estirpe BE apresenta (em conjunto com a estirpe F) a maior concentração de ácido cítrico alcançada à escala piloto; no entanto, a microescala foi a estirpe que apresentou valores mais baixos.

#### Ácido acético, Acidez total e pH

A Tabela III.18 expõe os resultados referentes ao ácido acético, acidez total e pH, dos vinhos produzidos em microescala.

Tabela III.18 Concentrações de ácido acético ( $C_{Acético}$ ) determinado por HPLC, acidez total (AT) e pH determinado por FTIR – vinhos produzidos em microescala, e respetivo erro associado ( $p=0,05$ )

	$C_{Acético}/(g L^{-1})$	AT/(g L <sup>-1</sup> )	pH
<b>BE</b>	$0,36 \pm 0,39$	$7,38 \pm 0,76$	$3,36 \pm 0,10$
<b>M</b>	$0,56 \pm 0,09$	$6,50 \pm 1,14$	$3,41 \pm 0,10$
<b>F</b>	$0,41 \pm 0,54$	$6,68 \pm 0,48$	$3,39 \pm 0,04$
<b>S</b>	$0,41 \pm 0,08$	$7,07 \pm 0,56$	$3,35 \pm 0,03$
<b>CM</b>	$0,40 \pm 0,15$	$7,17 \pm 0,33$	$3,36 \pm 0,04$
<b>Lalvin QA23®</b>	$0,37 \pm 0,30$	$6,75 \pm 0,18$	$3,39 \pm 0,02$

No que concerne aos resultados de ácido acético, verificou-se uma tendência geral para estes adquirirem valores mais baixos em microescala do que à escala piloto. Todavia, os erros associados a este parâmetro voltam a evidenciar-se.

Os parâmetros de AT e de pH apresentaram valores com um elevado grau de semelhança, mostrando-se praticamente independentes da escala em estudo. As estirpes

M, S e Lalvin QA23® apresentaram exatamente os mesmos valores de acidez total, independentemente da escala em estudo.

# IV – Conclusões e Perspetivas de Trabalho



## 17. Principais conclusões

O objetivo deste estudo incidiu na avaliação da capacidade enológica de cinco estirpes de *S. cerevisiae* (BE, M, F, S e CM) tendo a estirpe comercial Lalvin QA23® servindo como padrão. Os ensaios ocorreram em diferentes volumes de estudo, 50 mL e 20 L.

No que diz respeito à cinética de fermentação destacaram-se as estirpes F e CM, sendo capazes de acompanhar, a já conhecida, rápida cinética de fermentação da estirpe comercial. Relativamente à produção de espuma destacam-se, a estirpes BE (elevada produção) e a estirpe M (produção praticamente nula), todas as demais estirpes em estudo tiveram comportamento semelhante à estirpe comercial. Por fim, ressalta-se a estirpe F devido a um defeito a nível sensorial, característico do aroma a “ovos podres”, levando a estimar a elevada produção de H<sub>2</sub>S.

Os diferentes parâmetros avaliados a nível físico-químico apresentaram valores bastante próximos levando a supor a sua independência da estirpe em estudo, mesmo quando comparados com o padrão – Lalvin QA23®. Todos os vinhos produzidos à escala piloto (FA até densidade constante) caracterizaram-se como vinhos secos, sendo que o teor de açúcares foi aproximado de 1 g L<sup>-1</sup>. Como exceção, apresentou-se a estirpe M obtendo um teor final aproximadamente de 6 g L<sup>-1</sup> e por isso é designado como vinho adamado. No que diz respeito ao TAV, encontraram-se valores entre 10 % e 11 %. Apenas a estirpe S obteve um TAV menor, especificamente 8,13 %. Assim, verifica-se que todas as estirpes foram capazes de degradar os açúcares inicialmente presentes no mosto com consequente formação de etanol, demonstrando-se a sua capacidade enológica.

Compostos voláteis maioritários e minoritários do aroma apresentam ligeiras diferenças de resultados, comprovando assim, que a partir do mesmo mosto é possível produzir diferentes vinhos aromáticos.

Relativamente aos álcoois superiores, apenas se dá ênfase ao composto 2-feniletanol (descriptor floral - rosas), o qual foi encontrado em valores acima do seu LPO independentemente da estirpe, no entanto mais evidenciado no caso da estirpe BE. Em relação aos compostos voláteis minoritários, os teores encontrados de cada composto foram muito similares. No entanto, o peso percentual de cada grupo (principalmente no que diz respeito ao aroma secundário) foi distinto. Mostrando assim, que a partir do mesmo mosto é possível produzir vinhos com diferentes características sensoriais.

Destacam-se os ésteres de ácidos gordos (em especial o octanoato de etilo), conferindo um aroma frutado a maçã e papaia. O acetato de isoamilo, que apresenta como descritor aromático a banana, foi também encontrado em valores bastante acima do seu *LPO*. Por outro lado, considerando que a tipicidade aromática dos *Vinhos Verdes* (aroma primário) recai num aroma frutado (frutos frescos, como banana, maçã e pera) e em alguns casos certas notas florais (a rosas), considera-se espectável encontrar em elevadas concentrações os compostos mencionados. No entanto, o ácido octanóico ultrapassou também em muito o *LPO*, atribuindo assim ligeiro odor a “suor” e queijo.

Os valores dos parâmetros encontrados a nível físico-químico, não foram posteriormente suportados a nível sensorial. Os vinhos produzidos a partir da estirpe S foram os mais apreciados a nível aromático, tendo sido encontradas notas a frutos tropicais e florais; seguidamente evidenciou-se a estirpe CM com aroma intenso a frutos de árvore. O vinho produzido pela estirpe F foi o menos apreciado, tendo-lhe sido detetado de imediato o defeito sensorial odor a “ovos podres”. No que diz respeito aos parâmetros equilíbrio, estrutura e persistência ao nível do sentido gustativo, destacaram-se também as estirpes S e CM pelas boas qualidades demonstradas e, em contrapartida, a estirpe F por motivos contrários. A nível visual, a estirpe M evidenciou-se pela sua excelente capacidade de produção de vinhos límpidos.

Todas as estirpes demonstraram potencial enológico, sendo capazes de levar a cabo a fermentação alcoólica em condições similares a uma adega. No entanto, ressalta-se a capacidade fermentativa (a nível sensorial) das estirpes CM e S (enaltecendo as suas excelentes capacidades aromáticas), mostrando-se como boas concorrentes face à estirpe comercial Lalvin QA23® e exibindo potencial de inserção no mercado. Além das estirpes já mencionadas, destaca-se a estirpe M, pelo seu comportamento diferencial e demonstrando também, características aromáticas promissoras.

Apesar de os ensaios a microescala (50 mL) terem sido apenas analisados a nível físico-químico conclui-se que os resultados obtidos nos diferentes volumes foram semelhantes. Assim, verificou-se a reprodutibilidade de resultados no aumento de escala de fermentação. Apenas se notificou um atraso cinético da fermentação (aquando da monitorização) a menor escala.

## 18. Perspetivas de trabalho

A realização do presente trabalho permitiu obter informação relevante acerca do comportamento fermentativo das diferentes estirpes utilizando mosto branco dessulfitado. No entanto, seria importante testar o comportamento das estirpes num mosto fresco. Salienta-se ainda, o interesse em testar mostos de diferentes castas, e/ou regiões. Por outro lado, estudos em mosto tinto poderão valorizar o estudo das estirpes em questão.

No sentido de verificar a capacidade de reprodutibilidade de resultados de cada estirpe, seria interessante testar a fermentação contando com várias réplicas, ao invés de apenas duas.

Visando a descrição do comportamento fermentativo de cada estirpe, seria interessante quantificar a produção de  $H_2S$ .

Por forma a evitar a incapacidade de dissolução do ácido tartárico, após congelamento, aconselha-se a diluir a amostra de 1:2, antes de a congelar. Por outro lado, seria também interessante quantificar o ácido succínico.

Por fim, considera-se igualmente essencial, quantificar os tióis voláteis, compostos chave do aroma dos vinhos produzidos pelas estirpes em estudo.



# Referências Bibliográficas



- Amaral JD (1994) O Grande Livro do Vinho. *Círculo de Leitores*.
- Amerine MA, Roessler EB (1983) Wines: their sensory evolution. *W. H. Freeman and Company*, São Francisco, USA.
- Andrade M (2012) Estabilização tartárica de vinhos por combinação de nanofiltração e permuta catiónica. *Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Vinho. Universidade Católica Portuguesa, Portugal*.
- Baleiras-Couto M, Silvestre J (2012) Folha informativa de INIA-Dois Portos n.º 192. *INRB/INIA—Dois Portos*.
- Baleiras-Couto M, Silvestre J (2013) Folha informativa de INIA-Dois Portos n.º 204. *INRB/INIA—Dois Portos*.
- Baumes RL, Bayonova CL, Günata YZ (1994) Connaissances actuelles sur le potentiel aromatique des muscats. *Progres Agricole et Viticole*, 111, 251–256.
- Barnett JA (2000) A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast*, 16, 755–71.
- Barnett JA, e Entian KD (2005) A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast*, 22, 835–94.
- Bayonove CL, Baumes RL, Crouzet J, Günata YZ (1998) Arômes. In: OEnologie - Fondements Scientifiques et Technologiques. *Lavoisier Tec & Doc*, Paris, 163–235.
- Beltran G, Torija MJ, Novo M, Ferrer N, Poblet M, Guillamon JM, Rozes N, and Mas A (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 287–293.
- Bisson L (2004) The biotechnology of wine yeast. *Food Biotechnology*, 18, 63–96.
- Boidron JN, Chatonnet P, Pons M (1988) Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Conn. Vigne et Vin*, 22, 275–294.
- Bonino M, Schellino R, Rizzi C, Aigotti R, Delfini C, Baiocchi C (2003) Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS–SPME analysis coupled with GC–ITMS, *Food Chemistry*, 80, 125–133.
- Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF e Kunkel RE (1996) Principles and practices of winemaking. *Chapman & Hall, New York*.
- Casalta E, Agüera E, Picou C, Rodríguez-Bencomo JJ, Salmon JM, Sablayrolles (2010) A comparison of laboratory and pilot-scale fermentations in winemaking conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 1665–1673.

- Cardoso dos Santos JI (2003) Vinhos O Essencial. *Editora Senac 4ed*, São Paulo.
- Carvalho J (2011) Análise sensorial de vinhos. *Laboratório de Química Enológica da DRAPC*.
- Chatonnet P (1993) Fenoli volatile: influenze organolettiche e metodi di prevenzione. *Vignevini*, 20, 26–34.
- Chu S, Downes JJ (2000) Odour-evoked autobiographical memories: psychological investigation of the Proustian Phenomena. *Chemical Senses*, 25, 111–116.
- Clarke R e Bakker J (2004) Wine Flavour Chemistry. *Blackwell Publishing Ltd*.
- Cordonnier RE, Bayonove CL (1978) Les comosantes variétaais et préfermentair de l'ârome des vins. *Parfums, Cosmétiques, Âromes*, 24, 67.
- Cordonnier RE, Bayonove CL (1981) Étude de la phase préfermentair de la vinification: extraction et formation de certains composés de l'arôme; cas des terpenols, des aldéhydes et des alcools en C<sub>6</sub>. *Vigne et Vin*, 15, 269–286.
- Cortés S, Gil ML, Fernández E (2005) Volatile composition of tradicional and industrial orujo spirits. *Food Control*, 16, 383-388.
- Culleré L, Escudero A, Cacho J, Ferreira V (2004) Gas chromatography olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1653–1660.
- Curvelo-Garcia AS, Silvestre J (2010) Folha informativa de INIA-Dois Portos n.º 174. *INRB/INIA—Dois Portos*.
- CVRVV (2014) página WEB <http://www.cvrvv.pt/>. Consultada em 10 de Outubro.
- Czerny M, Christlbauer M, Fischer A, Granvogl M, Hammer M, Hartl C, Schieberle P (2008) 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 Technology*, 228, 265–273.
- Escudero A, Gogorza B, Melus MA, Ortin N, Cacho J, Ferreira V (2004) Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3516–3524.
- Esteve-Zarzoso B, Manzanares P, Ramón D, Querol A (1998) The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology*, 1, 143–148.

- 
- Etièvant PX (1991) Wine. In: Volatile Compounds in Food and Beverages, *Henk Fazzalari, ASTM Data Series DS48A*, Philadelphia, Pa.
- Escudero A *et al.* (2004) Characterization of the Aroma of a Wine from Maccabeo. Key Role Played by Compounds with Low Odor Activity Values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3516–3524.
- Ferreira V *et al.* (2000) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 1659–1667.
- Fleet GH (1993) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers GmbH.
- García-Jares C, Garcia-Martin S, Cela-Torrijos R (1995) 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*, 43, 764.
- Genisheva Z (2007) Caracterização aromática varietal das castas brancas recomendadas para a produção de vinho verde. *Tese de Mestrado em Bioengenharia. Universidade do Minho, Portugal*.
- Genisheva Z, Vilanova M, Mussatto SI, Teixeira JA, Oliveira JM (2014) Consecutive alcoholic fermentations of white grape musts with yeasts immobilized on grape skins – effect of biocatalyst storage and SO<sub>2</sub> concentration on wine characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1114–1122.
- Guerra CC (1998) Evolução polifenólica: longevidade e qualidade dos vinhos tintos finos. *In: Seminário Franco - Brasileiro De Viticultura, Enologia E Gastronomia, 1. Anais. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho*, 55-65.
- Gutierrez LE (1993) Produção de álcoois superiores por linhagens *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. *Scientia Agricola*, 50, 464–472.
- Guth H (1997) Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 45, 3027–3032.
- Hashizume T (2001) Tecnologia do vinho. Em: Aquarone E, Borzani W, Schimidell W, Lima UA, *Biotecnologia industrial*, 21–66.
- IVV (2014) página WEB <http://www.ivv.min-agricultura.pt/>. Consultado em 10 de Outubro.

- ISO 3591 (1977) Sensory analysis - Apparatus - Wine-tasting glass.
- ISO 11035 (1994) Sensory analysis - Identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach.
- Jackson RS (2002) Wine Tasting: A Professional Handbook. *Elsevier Academic Press*.
- Jackson RS (2008) Wine Science: Principles and Applications, *Elsevier Inc 3rd ed*.
- Lepe JS (1995) Aromas de fermentación, defectos olfativos y metabolismo microbiano. *XXI Congreso Mundial de la Viña y el Vino*. 75ª Asamblea General de la OIV, Uruguay, 27 Novembro - 4 Dezembro, 95–120.
- Magalhães N (2008) Tratado de Viticultura A videira A vinha O terroir. *Chaves Ferreira Publicações*.
- Malajovich MA (2004) Biotecnologia 2011. *Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT*.
- Malherbe S, Tredoux AGJ, Nieuwoudt HH, du Toit M (2012) Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 477–494.
- Martì MP, Mestres M, Sala C, Busto O, e Guash J (2003) 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*, 51, 7861–7865.
- Martins A (2004) Métodos de selecção de plantas de propagação vegetativa - o caso tipo da videira. *Boletim Informativo da Associação Portuguesa de Horticultura*, Abril, 77, 3–10.
- Masneufe I, Murat ML, Naumov GI, Tominaga T, Dubourdieu D (2002) Híbridos *Saccharomyces Cerevisiae* x *Saccharomyces Bayanus* var. *Uvarum* having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of *Vitis Vinífera* Sauvignon Blanc wines, *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 36, 205–212.
- Meilgaard MC (1975) Flavour chemistry of beer. Part II: flavour and threshold of aroma volatiles. *MBAA Technical Quarterly*, 12, 151–168.
- Meilgaard MC, Civille GV, Carr BT (1999) Sensory evaluation techniques. *CRC Press*, 3 ed.

- Mills DA, Johannsen EA, Cocolin L (2002) Yeast Diversity and Persistence in Botrytis-Affected Wine Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4884–93.
- Moreira JL, Marcos AM, Barros P (2002) Analysis of Portuguese Wines by Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 17, 23–33.
- Mortimer R, e Polsinelli M (1999) On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150, 199–204.
- Moreno JA, Zea L, Moyano L, Medina M (2005) Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control*, 16, 333–338.
- Morrot G, Brochet F (2000) Ce que le nez peut dire. In: La Dégustation. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 15–18.
- Navarre C (1997) Enologia: Técnicas de produção do vinho. *Publicações Europa-América. Lisboa.*
- NP 4263 (1994) Análise Sensorial- Vocabulário. IPQ, Lisboa.
- Oliveira AJ e Pinho (1993) – Compêndio de Ampelologia. *Porto/Lisboa: Figueirinhas.*
- Oliveira JM (2000) Aromas Varietais e de Fermentação Determinantes da Tipicidade das Castas Loureiro e Alvarinho. *Tese de Doutoramento. Universidade do Minho., Portugal.*
- Oliveira JM, Oliveira P, Baumes RL, Odete M (2008) Volatile and Glycosidically Bound Composition of Loureiro and Alvarinho Wines. *Food Science and Technology International*, 14.
- OIV-OENO 390 (2010) Guidelines on infrared analysers in oenology.
- OIV-OENO 370 (2012) Guidelines for the characterization of wine yeasts of the genus *Saccharomyces* isolated from vitivinicultural environments.
- OIV (2009) Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts.
- Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J (2000) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 34–50.
- Pato O (1988) O vinho: sua preparação e conservação. *Livraria Classica Editora*, 8. ed. *Lisboa.*
- Peinado RA, Moreno J, Bueno JE, Moreno JA, Mauricio JC (2004) Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84, 585–590.

- Peixoto FMC (1994) Alguns aspectos químicos do odor. *Química*, 52, 30–32.
- Peynaud E (1980) *Le Goût du Vin*. Dunod, Bordas, Paris.
- Peynaud E, Blouin J (2004) *Enología práctica: Conocimiento y elaboración del vino*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Pereira GM (1998) Enciclopédia dos Vinhos de Portugal: O Vinho do Porto e os Vinhos do Douro, *Chaves Ferreira Publicações, S. A., Lisboa*.
- Ranieri S, Pretorius IS (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*, 50, 15–31.
- Rapp A, Mandery H (1986) Wine aroma. *Experientia*, 42, 873–884.
- Rapp A, Versini G (1995) Fehleroma: Die untypische alterungstone, *Der Deutsche Weinbau* 18, 18–22.
- Rainieri S, Pretorius LS (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*, 50, 15–31
- Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (2000) Handbook of enology – The chemistry of wine stabilization and treatment. Volume 2. *John Wiley & Sons, Ltd, Londres*.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donéche B, Lonvaud A (2006) Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications, 2nd ed. *John Wiley & Sons Ltd., England*.
- Rizzon LA, Miele A (2006) Efeito da safra vitícola na composição da uva, do mosto e do vinho Isabel da Serra Gaúcha, Brasil. *Ciência Rural*, 36, 959–964.
- Russell JD, Fraser AR (1994) Infrared methods. Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods, *Springer-Science+Business Media, B.V* 11–67.
- Silva ML, Malcata FX e de Revel G (1996) Volatile contents of grape marcs in Portugal. *Journal of Food Composition and Analysis*, 9, 72–80.
- Simpson RF (1979) Some important aroma components of white wine. *Food Technology in Australia*, 516–522.
- Schuller DE, Alves H, Dequin S, Casal M (2005) Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 167–177.

- Schuller DE, Casal M (2007) The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis, *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 137–150.
- Stidwell TG (2001) The use of enzymes for increased aroma formation in wine. *Tese de Mestrado. Univorsiiy of Stellenbosch, África do Sul*.
- Thibon C, Shinkaruk S, Jourdes M, Bennetau B, Dubourdieu D, Tominaga T (2010) Aromatic potential of botrytised white wine grapes: identification and quantification of new cysteine-S-conjugate flavor precursors. *Analytica Chimica Acta*, 660, 190–196.
- Tominaga T, Darriet Ph, Dubourdieu D (1996) Identification de l'acetate de mercapto hexanol, composé a forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. *Vitis: Journal of grapevine research*, 35, 207–210.
- Torija Ma J, Rozès N, Poblet M, Guillamón JM, Mas A (2002) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 47–53
- Triulzi, Scotti (2008) 102.º Curso Intensivo de Vinificação, *Estação Vitivinícola da Bairrada, em Anadia*.
- Vieira E, Drumonde-Neves J, Machado R, Silva P, Gomes AC, Sousa S, Ramos PT, Alemão F, Lima MT, Araújo I, Duarte FL, Santos MA, Casal M, Schuller DE (2010) A coleção de estirpes autóctones de *Saccharomyces cerevisiae* das principais regiões vitivinícolas portuguesas. *Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo 7*, Évora.
- Vieira E (2013) Estirpe de *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Wine – Wine Solutiones, Lda. Patent WO2013153540 A1*.
- Vilanova M, Genisheva Z, Masa A, e Oliveira JM (2010) Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. *Microchemical Journal*, 95, 240–246.
- Vilanova M, Oliveira JM (2012) Application of Gas Chromatography on the Evaluation of Grape and Wine Aroma in Atlantic Viticulture (NW Iberian Peninsula). *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*, Dr. Bekir Salih (Ed.).
- Vilela-Moura A, Schuller D, Mendes-Faia A, Silva RD, Chaves SR, Sousa MJ, Côrte-Real M (2011) The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and

## Referências Bibliográficas

---

wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 271–280.

Vinalia (2014) página WEB <http://www.vinalia.com.pt/>. Consultada em 12 de Setembro.

Webb AD, Ingraham JL (1963) Fusel oil. *Advances in Applied Microbiology* 5, 317–353.

Wlodarczyk SR, Souza RC, Bonfim TMB, Brand D, Silva GA (2013) Evaluation of Isolated Yeasts from Grapes of Pinto Bandeira Region, Bento Gonçalves (RS) in relation to Production of H<sub>2</sub>S and Fermentation Rate. *Biochemistry and Biotechnology Reports*.

# Anexos



## ANEXO A: Doseamento de SO<sub>2</sub> (antes do engarrafamento)

Antes de proceder ao engarrafamento, realizou-se o doseamento de SO<sub>2</sub> livre e combinado, por titulação iodométrica direta e, por titulação iodométrica após hidrólise alcalina, respetivamente conforme a metodologia estabelecida pela OIV (OIV-MA-AS323-04B: R2009; OIV-MA-AS323-04C: R2009). Os resultados estão dispostos na Tabela A.1.

Tabela A.1: Concentração (C) de SO<sub>2</sub> livre e combinado

Fermentador	SO <sub>2</sub> livre C/(mg L <sup>-1</sup> )	SO <sub>2</sub> combinado C/(mg L <sup>-1</sup> )
1 – estirpe BE	11,20	111,52
2 – estirpe BE	7,68	138,40
3 – estirpe M	14,08	133,92
4 – estirpe M	9,44	127,04
5 – estirpe F	16,16	144,32
6 – estirpe F	15,52	155,68
7 – estirpe S	11,04	126,24
8 – estirpe S	16,00	126,24
9 – estirpe CM	14,24	158,88
10 – estirpe CM	16,80	124,64
11 – estirpe Lalvin QA23®	14,08	116,48
12 – estirpe Lalvin QA23®	15,04	108,48

Antes do engarrafamento, procedeu-se novamente à sulfitação do vinho, numa tentativa de ter uma dose média de SO<sub>2</sub> de 40 mg L<sup>-1</sup>.

## ANEXO B: Ficha de prova

Ficha de prova utilizada na análise sensorial do vinho produzido à escala piloto (Figura B.1).

<b>Exame visual</b>		<b>Provedor:</b>
Limpidez	0 1 2 3 4 5	<b>Amostra:</b>
Cor	0 1 2 3 4 5	
Qualidade da cor	0 1 2 3 4 5	
<b>Exame olfativo</b>		<b>Descritores</b>
Intensidade	0 1 2 3 4 5	-----
Floral	0 1 2 3 4 5	-----
Fruto citrino	0 1 2 3 4 5	-----
Fruto de árvore	0 1 2 3 4 5	-----
Fruto tropical	0 1 2 3 4 5	-----
Fruto seco	0 1 2 3 4 5	-----
Especiarias	0 1 2 3 4 5	-----
Mineral	0 1 2 3 4 5	-----
Vegetal	0 1 2 3 4 5	-----
Impressão geral	0 1 2 3 4 5	-----
<b>Exame gustativo</b>		
Doçura	0 1 2 3 4 5	-----
Acidez	0 1 2 3 4 5	-----
Calor	0 1 2 3 4 5	-----
Amargor	0 1 2 3 4 5	-----
Estrutura	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	-----
<b>Nota final (0 a 20)</b>		<b>Observações</b>

Figura B.1: Ficha de prova.

## ANEXO C: Monitorização à escala piloto

A Figura C.1 apresenta os gráficos relativos à evolução a fermentação alcoólica de cada estirpe, demonstrando a degradação de açúcares e consequente formação de etanol.

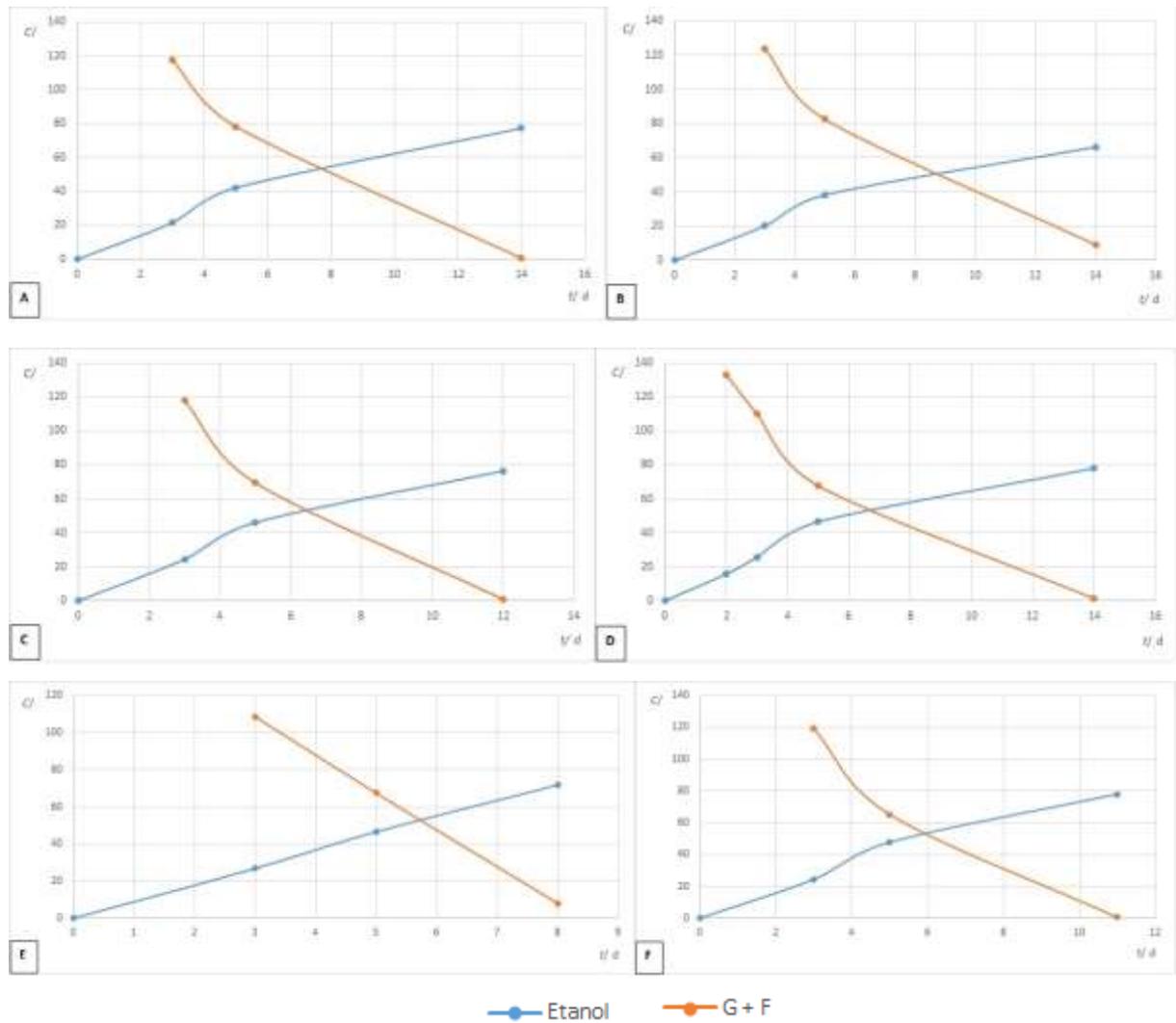


Figura C.1: Monitorização da FA à escala piloto: 1- BE, 2- M, 3- F, 4-S, 5- CM e 6-Lalvin QA23®.

## ANEXO D: Retas de calibração – HPLC

As retas de calibração foram construídas com 6 pontos (incluindo o zero) com as seguintes concentrações máximas para cada composto. A Tabela D.1 apresenta os valores de concentração máxima utilizados para a calibração.

Tabela D.1: Concentração máxima ( $C$ ) dos vários compostos utilizados para calibração

Composto	$C$
Etanol	70 mL L <sup>-1</sup>
Glicerol	5 g L <sup>-1</sup>
Glucose	14 g L <sup>-1</sup>
Frutose	14 g L <sup>-1</sup>
Ácido cítrico	500 mg L <sup>-1</sup>
Ácido tartárico	2 g L <sup>-1</sup>
Ácido málico	1,5 g L <sup>-1</sup>
Ácido succínico	500 mg L <sup>-1</sup>
Ácido láctico	750 mg L <sup>-1</sup>
Ácido acético	500 mg L <sup>-1</sup>

Na Tabela D.2 estão definidas as equações das retas de calibração para cada composto e respetivo coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

Tabela D.2: Equações das retas de calibração para cada composto e respetivo coeficiente de correlação ( $R^2$ )

Composto	Equação da reta	$R^2$
Etanol	$A(\text{mV s}) = (1422,6 \pm 75,75) C/(\text{g L}^{-1}) - (130,14 \pm 225)$	0,9985
Glicerol	$A(\text{mV s}) = (481,05 \pm 11,23) C/(\text{g L}^{-1}) - (347,4 \pm 1111,80)$	0,9985
Glucose	$A(\text{mV s}) = (1696,1 \pm 42,68) C/(\text{g L}^{-1}) - (256,7 \pm 383,11)$	0,9997
Frutose	$A(\text{mV s}) = (1522,4 \pm 16,23) C/(\text{g L}^{-1}) - (37,19 \pm 136,31)$	0,9999
Ácido cítrico	$A(\text{mV s}) = (7390,7 \pm 134,52) C/(\text{g L}^{-1}) - (115,5 \pm 197,05)$	0,9974
Ácido tartárico	$A(\text{mV s}) = (4098,2 \pm 146,38) C/(\text{g L}^{-1}) - (84,024 \pm 131,98)$	0,9998
Ácido málico	$A(\text{mV s}) = (3315,8 \pm 439,45) C/(\text{g L}^{-1}) - (38,667 \pm 124,27)$	0,9993
Ácido succínico	$A(\text{mV s}) = (3932,1 \pm 370,84) C/(\text{g L}^{-1}) - (109,69 \pm 252,18)$	0,9910
Ácido láctico	$A(\text{mV s}) = (2837,6 \pm 157,68) C/(\text{g L}^{-1}) - (9,619 \pm 53,76)$	0,9954
Ácido acético	$A(\text{mV s}) = (4889,4 \pm 343,40) C/(\text{g L}^{-1}) - (53,952 \pm 125,80)$	0,9984

