



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

**Avaliação do perfil em aminoácidos de vinhos brancos da
casta Arinto fermentados em barricas com leveduras
Saccharomyces e leveduras nativas**

Thomas Henrique Dias

Orientador(es) | **Maria João Pires de Bastos Cabrita**

Évora 2019



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

**Avaliação do perfil em aminoácidos de vinhos brancos da
casta Arinto fermentados em barricas com leveduras
Saccharomyces e leveduras nativas**

Thomas Henrique Dias

Orientador(es) | **Maria João Pires de Bastos Cabrita**

Évora 2019



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | João Manuel Mota Barroso (Universidade de Évora)
- Vogal | Maria João Pires de Bastos Cabrita (Universidade de Évora)
- Vogal | Raquel Marta Neves dos Santos Garcia (Universidade de Évora)

“É nas adversidades que o ser humano evolui, sem fingimento porque o sonho nunca acaba”

Thiago Drews Brou

Dedicado aos meus pais.

Agradecimentos

A conclusão desta tese de mestrado não teria sido possível sem a cooperação de diversas pessoas, que de alguma forma contribuíram para fosse possível sua execução e claro graças a Deus, que guiou meu caminho até aqui.

Primeiramente quero agradecer aos meus pais Martinha e Ilaci por todos anos dedicados, toda educação que me proporcionaram e sempre estarem do meu lado apoiando e incentivando, sem eles nada disso seria possível na minha vida, amo vocês.

A minha namorada Gislaíne pelo constante apoio e ombro amigo, por ter que superar a distância e o longo tempo sem se ver, mas sempre juntos e que nunca me deixou desistir e acreditou que eu iria terminar mais uma etapa, te amo.

A todos os meus familiares principalmente aos meus avós que sempre torceram por mim.

Quero agradecer à professora Maria João Cabrita, pela sua orientação nesta dissertação de mestrado, pelos conhecimentos científicos transmitidos ao longo da realização da mesma, e durante o curso e também pela disponibilidade e paciência no esclarecimento de dúvidas e pelo acompanhamento e apoio no decorrer deste trabalho.

Quero agradecer a Fita Preta Vinhos, por ter concedido as amostras das vinificações do seu ensaio para a elaboração deste trabalho.

Ao Nuno Martins, que foi uma ajuda imprescindível no que diz respeito ao HPLC e o seu funcionamento. E ao Rui Bicho, pela sua colaboração e constante acompanhamento no laboratório de Enologia da Universidade de Évora.

Aos meu colegas e amigos que me acompanharam ao longo desta jornada e torceram por mim.

Agradecimentos

Aos amigos de curso, pelos momentos de alegria, aprendizado e principalmente nos momentos mais difíceis; ao amigo André Ribeiro que me ajudou a conseguir o primeiro trabalho em uma adega e primeira vindima nos Açores, além de toda experiência e ensinamentos que me foi passado; ao amigo João Costeira que me recebeu em sua casa para celebrar o natal com sua família, além de trabalharmos juntos durante a vindima e tivemos que ter muita paciência para concluí-la; aos amigos David e Ricardo pelas várias provas de vinhos e momento de alegria; à Ana Moura que me recebeu em sua casa para celebrar a passagem de ano com sua família; à Angela pelas conversas sobre momentos difíceis da vida em Portugal; e todos os outros amigos que de alguma forma participaram desta etapa.

Por fim, agradeço também à Universidade de Évora, pela oportunidade de atingir o objetivo de concluir o mestrado em Viticultura e Enologia e a realização do trabalho de tese.

“Avaliação do perfil em aminoácidos de vinhos brancos da casta Arinto fermentados em barricas com leveduras *Saccharomyces* e leveduras nativas”

Diferentes espécies de levedura possuem características específicas no seu metabolismo, que produzem diversos tipos de compostos primários e secundários, que irão influenciar muitas das características finais do vinho.

Os aminoácidos são compostos azotados diretamente relacionados ao metabolismo das leveduras. Estão presentes nas uvas e no vinho, e são utilizados pelas leveduras, exceto a prolina, durante o processo de fermentação do mosto.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o perfil de aminoácidos livres em vinhos brancos da casta Arinto fermentados em barricas de carvalho francês, com três diferentes leveduras comerciais (QA23, CY3079, EC1118) e uma fermentação com leveduras indígenas.

A técnica utilizada para quantificação e identificação dos aminoácidos foi a cromatografia líquida de alta eficiência, com detetor *Diode Array*, utilizando o comprimento de onda de 280 nm para as análises.

Foram feitos o teste ANOVA e observou-se nos resultados obtidos que houve diferenças significativas para os aminoácidos: Glutamina, Serina, Asparagina, Glicina, Arginina, Alanina, Glicina, Metionina, Prolina) entre as leveduras utilizadas nos ensaios.

Foi feito teste de análise discriminante canônica (CDA) e observou-se nos resultados obtidos que houve a formação de quatro grupos distintos respetivos as leveduras utilizadas.

Palavras-Chave: Vinho branco, Aminoácidos, Leveduras indígenas, HPLC - DAD

“Evaluation of the amino acid profile in white Arinto wines fermented with *Saccharomyces* yeasts and native yeasts”

Different species of yeast have specific characteristics in their metabolism, which produce various types of primary and secondary compounds, which will influence many of the final characteristics of wine.

Amino acids are nitrogenous compounds directly related to yeast metabolism. They are present in grapes and wine, and are used by yeast, except proline, during the must fermentation process.

This work was carried out in order to evaluate the amino acid profile of white Arinto wines fermented in French oak barrels, with three different commercial yeasts (QA23, CY3079, EC1118) and a fermentation with indigenous yeasts.

The technique used to quantify and identify amino acids was high performance liquid chromatography with Diode Array detector using 280 nm wavelength for analysis.

The ANOVA test was performed and it was observed in the obtained results that there were significant differences for the amino acids: Glutamine, Serine, Asparagine, Glycine, Arginine, Alanine, Glycine, Methionine, Proline) between the yeasts used in the assays.

Canonical discriminant analysis (CDA) test was performed and it was observed in the obtained results that there was the formation of four distinct groups respective yeasts used.

Keywords: White wine, Amino acids, Indigenous yeasts, HPLC - DAD

Abreviaturas

AA – Aminoácidos

DAD - Detector Diode Array

DEEMM - Diethyl ethoxymethylenemalonate

DP – Desvio Padrão

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

OIV – Organização Internacional da Vinha e do Vinho

PI - Padrão Interno

Tr – Tempo de retenção

YAN – Azoto facilmente assimilável

mg.L-1 - Miligrama por litro

nm – Nanômetro

pH – Potencial Hidrogeniônico

SO₂ - Dióxido de enxofre ou anidrido sulfuroso

H₂S - Sulfeto de hidrogênio

g.L-1 - gramas por litro

meq.L-1 - milequivalente por litro

vol/vol - volume por volume

v.v -1 - volume por volume

% - porcentagem

L – litro

µg.L-1 - microgramas por litro

Hat – ácido tartárico

Hac – ácido acético

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ABREVIATURAS	V
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURA	IX
ÍNDICE DE TABELA	X
ÍNDICE DE GRÁFICO	XI
1.INTRODUÇÃO	1
1.1.Problemática	1
1.2.Objetivos	2
2.FUNDAMENTO TEÓRICO	3
2.1.Terroir	3
2.2.Leveduras não-Saccharomyces e Saccharomyces	4
2.3.Importância do azoto	8
2.3.1.Compostos azotados nas uvas, no mosto e no vinho	9
2.3.2.Azoto Amoniacal (inorgânico)	10
2.3.3.Azoto orgânico	11
2.3.4.Aminoácidos (AA)	11

Índice

3.IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO VINHO	15
4.CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)	16
4.1.Princípios básicos	16
4.2.Derivatização	19
4.3.Padrão Interno	20
5.METODOLOGIA	21
5.1.Ensaio e Vinificações	21
5.2.Caracterização físico-química dos vinhos	21
5.3.Identificação e quantificação de aminoácidos por HPLC-DAD	24
5.3.1.Aminoácidos analisados	24
5.3.2.Preparação dos padrões	25
5.3.3.Preparação das amostras	25
5.3.4.Condições de quantificação de aminoácidos por HPLC-DAD	26
6.ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	29
7.RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
7.1.Caracterização físico-química dos vinhos	29
7.2.Quantificação dos aminoácidos nos vinhos e teste ANOVA	31
7.3.Resultados da Análise discriminante canônica (CDA)	35
8.CONCLUSÕES	39
9.LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	40
10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

Índice

11.ANEXO I	46
12.ANEXO II	49

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura geral de um aminoácido (Fonte: Bruce Alberts et al., 2017; Nelson, 2014)	11
Figura 2: Principais aminoácidos no vinho (Adaptado de: (Ribéreau-Gayon et al., 2006).	14
Figura 3: Gráfico ilustrativo do tempo de retenção	17
Figura 4: Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência [HPLC] (Adaptado de: (Waters 2017)).	18
Figura 5: Algumas das amostras analisadas.	22
Figura 6: Análise de acidez volátil.	22
Figura 7: Potenciômetro utilizado nas análises.	23
Figura 8: Filtração das amostras para tubos de HPLC	26
Figura 9: HPLC Alliance Waters (Mitra).	27
Figura 10: Cromatograma no c.d.o de 280 nm referente a uma amostra.	32
Figura 11: Gráfico das Funções discriminantes canonical	37
Figura a 1: Ficha técnica da levedura CY3079.	49
Figura a 1: Ficha técnica da levedura CY3079.	50
Figura a 2: Ficha técnica da levedura EC1118.	51
Figura a 2: Ficha técnica da levedura EC1118.	52
Figura a 3: Ficha técnica da levedura QA23.	53
Figura a 3: Ficha técnica da levedura QA23.	54

Índice de Tabelas

Tabela 1: Nomes e abreviações dos 20 aminoácidos comuns (Adaptado de: (Campbell & Farrel,2007)).	12
Tabela 2: Aminoácidos estudados neste experimento.	24
Tabela 3: Reação de derivatização.	25
Tabela 4: Condições da análise de HPLC.	28
Tabela 5: Valores médios (\pm DP) dos parâmetros enológicos analisados.	29
Tabela 6: Tempo de retenção e equação das retas de calibração para cada aminoácido.	31
Tabela 7: Funções discriminantes usadas na análise e sua distribuição.	35
Tabela 8: Coeficientes padronizados de cada aminoácido para as três funções.	36
Tabela 9: Valores de Wilki's Lambda	37
Tabela a 1: Valores dos parâmetros enológicos analisados.	46
Tabela a 2: Valores médios de concentração mg/L (\pm desvio padrão) de cada AA nos vinhos, valores de concentração Máx. Mín., e teste ANOVA.	47
Tabela a 3: Valores médios de concentração mg/L (\pm desvio padrão) de cada AA nos vinhos, valores de concentração Máx. Mín., e teste ANOVA.	48

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Concentração de Ác. Glutâmico para cada levedura.	33
Gráfico 2: Concentração de Glutamina para cada levedura.	33
Gráfico 3: Concentração de Glicina para cada levedura.	33
Gráfico 4: Concentração de Arginina para cada levedura.	33
Gráfico 5: Concentração de Prolina para cada levedura.	33
Gráfico 6: Concentração de Asparagina para cada levedura.	33
Gráfico 7: Concentração de Alanina para cada levedura.	34
Gráfico 8: Concentração de Metionina para cada levedura.	34
Gráfico 9: Concentração de Serina para cada levedura.	34

1. Introdução

1.1. Problemática

No mundo dos vinhos muito se fala sobre o termo “Terroir”, que em resumo pode ser definido como sendo um conjunto de fatores naturais de determinada região como: solo, clima, topografia (altitude, relevo), entre outros, criando condições edafo-climáticas específicas da região, que ao interagir com a genética da planta, se expressam, em forma de sabores, aromas, cores e etc.

Durante a elaboração de um vinho, sabe-se que muitos fatores como técnicas e processos de vinificação podem interferir em termos qualitativos e sensoriais, de forma que irão favorecer ou não a chamada expressão do “Terroir”. Um ponto importante que se tem levado em consideração na elaboração de vinhos, que à partida expressam o “terroir”, é a utilização de leveduras comerciais e “leveduras nativas” (naturais, indígenas).

Na enologia moderna é possível observar duas filosofias de vinificação distintas, que estão ligadas diretamente aos dois grupos principais de leveduras. Os enólogos que defendem a utilização de “leveduras nativas”, que à partida expressam o “terroir” (vinha/clima do ano/solo/castas), remontando uma época em que não existia grandes tecnologias, nem utilização de leveduras comerciais, e os defensores das “leveduras selecionadas”, que procuram perfil frutado e expressão máxima da(s) casta(s) ou buscam por um estilo de vinhos mais comercial, com intenção de não ariscar a produção.

Além da fermentação alcoólica (conversão do açúcar em álcool), as leveduras produzem vários subprodutos, tais como ésteres (compostos voláteis que impactam nos aromas), aldeídos como por exemplo os acetaldeídos (precursores do ácido acético – vinagre), álcoois superiores e entre outros, que possuem uma vasta gama de influências nos sabores e aromas.

No entanto, as leveduras ainda são capazes de interagir com compostos azotados, enxofre e outros compostos fenólicos, além de metabolizar compostos relacionados aos sabores e criar outros durante sua autólise (autodestruição das células).

Dentre os compostos azotados, os aminoácidos (AA) constituem um papel muito importante relacionado com os aromas secundários (aromas que resultam da fermentação e da ação das leveduras sobre o mosto), são precursores de uma panóplia de aromas. Os aminoácidos estão presentes nas uvas e conseqüentemente no mosto, constituindo uma fonte de azoto assimilável pelas leveduras durante a fermentação alcoólica do mosto.

1.2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi verificar se a utilização de leveduras diferentes (comerciais e nativas) influenciam de algum modo o perfil de aminoácidos de vinho branco da casta Arinto fermentados em barricas de 2º uso.

Assim, com este trabalho pretendeu-se:

- Identificar e quantificar os aminoácidos livres, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detetor Diode Array (DAD);
- Avaliar a influência das diferentes leveduras no teor em aminoácidos de vinhos.

2. Fundamento teórico

2.1. Terroir

Na viticultura e enologia, utilizamos muito o termo francês “Terroir” (da palavra terre, que significa solo), que se refere basicamente as inúmeras interações entre o ambiente físico e as vinhas.

Segundo Magalhães (2010), o conceito “Terroir” surgiu no fim do século XIX, podendo ser definido como um conjunto de factores naturais que fazem parte das características e condições edafoclimáticas de uma determinada região.

Uma definição proposta pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) refere-se à originalidade do vinho produzido em um determinado terroir e, portanto, ao valor agregado:

“O “terroir” vitivinícola é um conceito que se refere a uma área na qual o conhecimento coletivo das interações entre o ambiente físico e biológico identificável e as práticas vitivinícolas aplicadas se desenvolve, fornecendo características distintivas para os produtos oriundos dessa área. “Terroir” inclui solo específico, topografia, clima, características da paisagem e características da biodiversidade.” (OIV, 2010, p. 1)

As características regionais edafoclimáticas onde as videiras crescem, tem grande influência no desenvolvimento e na maturação da uva e consequentemente influenciando os atributos sensoriais do vinho (van Leeuwen, 2010).

O Terroir pode ser definido como sendo um ecossistema muito complexo em um determinado local, na qual inclui diversos fatores, como: condições climáticas, cultivar, porta-enxerto, geografia e topografia. Além das características do solo e subsolo como nutrição mineral e abastecimento de água (Costantini et al., 2012; van Leeuwen, 2010).

Fatores humanos também devem ser incluídos, práticas de manejo, como: podas, irrigação, sistemas de condução entre outras (van Leeuwen & Seguin, 2006).

O reconhecimento do “Terroir” tem sido visto como um fator muito importante na qualidade e estilo de um vinho, especialmente nos vinhos europeus. O conceito de “Terroir” vem sendo definido mais especificamente, ao ponto de avaliarem as influências da microbiota nativa das uvas (ex: leveduras indígenas) nas características organolépticas dos vinhos de determinada região (Comitini et al., 2017).

2.2. Leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces*

O atual mercado de vinhos vem sofrendo uma forte tendência por vinhos que realmente expressam o chamado “terroir”. Sendo que, produções biodinâmicas e orgânicas onde se tem o menor ou nenhum uso de produtos químicos, aliado a uma produção de vinhos com fermentações espontâneas “levedura indígenas ou nativas”, na qual vêm atraindo a preferência de muitos consumidores.

Segundo o OIV, “terroir” refere-se a “uma área” e se pode determinar o “terroir microbiano”, que representa o microbioma do local que contribui para criar a identidade do vinho de determinada região, desde as vinhas, os diferentes estágios de fermentação até o vinho (Comitini et al., 2017)

As leveduras são as principais responsáveis pela fermentação alcoólica do vinho. Existe uma enorme variedade de espécies, de bactérias e leveduras que estão associadas a fermentação do mosto de uva para produção de vinho. A microbiota presente nas uvas e no mosto pode chegar a ter mais de 40 gêneros e 100 espécies diferentes de leveduras (Bisson et al., 2017).

As variadas espécies de leveduras que estão envolvidas no processo de vinificação influenciam diretamente na velocidade de fermentação, bem como na natureza e concentrações dos produtos secundários que são formados durante a fermentação alcoólica, influenciando assim as características organolépticas do vinho. Cada espécie pode possuir um grande número de estirpes e apresentarem variadas propriedades tecnológicas (Bell & Henschke, 2005).

Tradicionalmente e naturalmente ao longo da história milenar do vinho, as fermentações decorriam de forma espontânea usando leveduras presentes na superfície das uvas e no ambiente da adega, sem inoculação de cultura de espécies puras de interesse (Aranda et al., 2011).

A microbiota associada às uvas sofre interferência por muitos fatores: clima, topografia, localização geográfica das vinhas, composição do solo, práticas agrícolas, variedades utilizadas, vetores de insetos residentes e transitórios, vetores de aves e animais, atividade humana e adjacências, e tempo de colheita (Padilla et al., 2016; Bisson, 2017).

A microbiota de leveduras que está presente na superfície das uvas tem como predominância a espécie *Kloeckera apiculata*, sendo encontradas também em proporções menores outras espécies leveduras aeróbicas ou levemente fermentativas obrigatórias, com limitada tolerância ao álcool, pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Rhodotorula*. Espécies comumente responsáveis pela maior parte da fermentação como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus* estão presentes em baixas concentrações, sendo que, *Saccharomyces cerevisiae* está associada a flora presente nos equipamentos da adega (Fugelsang & Edwards, 2007; Ribereau-Gayon et al., 2006; Aranda et al., 2011).

As leveduras indígenas não *Saccharomyces* em contraste com as espécies de *Saccharomyces*, produzem durante a fermentação alcoólica diversas enzimas (esterases, glicosidases, lipases, 6-glicosidases, proteases, celulasas e etc), que podem interagir com compostos ativos de aroma tendo importante papel na influência do bouquet do vinho (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Nas condições de fermentação espontânea as primeiras horas após o enchimento das cubas com mosto a flora predominante pertence aos mesmos gêneros geralmente encontrados nas uvas, predominantemente *Hanseniaspora* / *Kloeckera*. Após cerca de 20 horas as leveduras do gênero *Saccharomyces* (principalmente *S. cerevisiae*) passam a se desenvolver em maior velocidade realizando o início da fermentação juntamente com a flora de levedura derivada da uva. Com decorrer da fermentação e conseqüente aumento das condições anaeróbicas e do teor alcoólico em aproximadamente 3 ou 4 dias as leveduras gênero *Saccharomyces* passam a predominar o mosto em fermentação e serão elas as responsáveis pela conclusão da fermentação alcoólica (Aranda et al., 2011, Ribéreau-Gayon et al., 2006).

As primeiras seleções de leveduras foram feitas por Louis Pasteur, há cerca de um século e meio atrás, com intuito de demonstrar o papel das leveduras nas fermentações. Mas somente há cerca de 80 anos se começou a selecionar leveduras direcionadas para produção do vinho. Primeiramente, com o objetivo de evitar fermentações paradas e lentas, avaliando a capacidade da levedura de converter rapidamente açúcar em etanol realizando de forma confiável a fermentação. Com a melhoria das técnicas de culturas de arranque, se iniciou a produção de fermentos

líquidos e posteriormente culturas iniciadoras ativas e enológicas, e foram mais aceitas pelos produtores de vinho. A partir da década de 1970, o uso de levedura seca ativa (ADY) facilitou enormemente a inoculação de levedura e se difundiu imensamente o uso da espécie *Saccharomyces cerevisiae* para realizar a fermentação do mosto, sendo utilizadas por muitos produtores de vinho na atualidade (Specht, 2010; Marullo, 2010; Ramón, 2011).

O gênero *Saccharomyces* pode possuir mais de 700 grupos mais bem definidos, denominados espécies como por exemplo a espécie *cerevisiae* (Specht, 2010).

A espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae* é sem dúvidas a mais adaptada ao ambiente de fermentação de vinhos, sendo também a espécie mais estudada. Apesar desta espécie ser pouco detectável no mosto de uva recém extraído sem inoculação, com decorrer da fermentação espontânea ela domina rapidamente as outras espécies de leveduras sendo responsável por concluir a fermentação alcoólica (Aranda et al., 2011; Prior, 2019).

A utilização de estirpes comerciais de leveduras como starters de fermentação, principalmente estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, tem por objetivo em primeiro lugar garantir uma dominância rápida do mosto de forma que a fermentação ocorra rapidamente e por completo tornando o processo previsível e reprodutível. Além disso, por dominar o meio rapidamente minimiza a contribuição das leveduras não *Saccharomyces* “indígenas, nativas”, caso não seja de interesse do enólogo, ou por afetar negativamente o progresso da fermentação e as características do produto final com compostos indesejáveis, como as aminas biogénicas. A inoculação tem por função também, ser utilizada quando se quer acentuar a componente de fruta no perfil de aroma e sabor do vinho, utilizando estirpes de levedura conhecidas para esta função (Bisson et al., 2017).

Por outro lado, acredita-se que as fermentações espontâneas dos mostos, apresentam uma maior variedade e complexidade das características do perfil aromático e de sabor do vinho contribuindo para que o vinho expresse o “terroir”, em contrapartida fermentações espontâneas podem ser muitas vezes imprevisíveis devido à complexidade microbiana, levando a produção de compostos indesejáveis e até mesmo paragens de fermentação ou fermentações incompletas (Bisson et al., 2017; Boynton & Greig, 2016; Comitini et al., 2017).

A influência das diferentes espécies de levedura no perfil organoléptico de um vinho está diretamente relacionada ao metabolismo das leveduras de acordo com os nutrientes disponíveis. A interação das leveduras com o mosto durante a fermentação alcoólica se faz por diversos mecanismos:

- (i) Utilizam os constituintes do mosto para aumento de biomassa,
- (ii) Produzem etanol e outros solventes que ajudam a extrair componentes de sabor e aroma das partes sólidas da uva,
- (iii) Produzem enzimas que transformam compostos neutros das uvas convertendo em compostos ativos,
- (iv) Produzem inúmeros metabólitos secundários ativos que contribuem para formação do perfil aromático e de sabor do vinho (por exemplo, ácidos, álcoois, ésteres, polióis, aldeídos, cetonas, compostos voláteis de enxofre),
- (v) Degradação autolítica de células de levedura mortas, que contribuem para liberação de aminoácidos orgânicos.

As exigências nutricionais variam de acordo com a espécie e a linhagem de levedura e conseqüentemente a produção de metabólitos secundários também irá variar (Fleet, 2003).

Durante a fermentação para além da produção de etanol e do CO₂, vários outros metabólitos secundários e subprodutos são produzidos pelas leveduras, dentre eles: glicerol, ácido succínico, ácidos acético e láctico, bem como acetaldeído, além de outras substâncias voláteis e não voláteis que contribuem de forma individual ou coletivamente nas características sensoriais do vinho (Fugelsang & Edwards, 2007).

2.3. Importância do azoto

O processo de fermentação alcoólica depende de inúmeros fatores, para que ocorra de forma completa e com cinética confiável, as condições do ambiente juntamente com as características nutritivas dos mostos, são de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento saudável das leveduras, garantindo uma biomassa de levedura ótima (Jiranek et al., 1995; Prior et al., 2019).

Os compostos azotados no vinho que podem ser utilizados pela levedura, são denominados de azoto assimilável à levedura (YAN - yeast assimilable nitrogen). O grupo de YAN, inclui o azoto na forma de aminoácidos livres, que são todos os aminoácidos exceto a prolina, que é um aminoácido proteinogênico, e as leveduras não são capazes de metabolizá-la sob condições anaeróbicas, e o azoto na forma amoniacal (Henschke & Jiranek, 1995; Prior et al., 2019; Mendes-ferreira et al., 2011).

Durante o processo de fermentação, cerca de 1 e 2 g / l de aminoácidos são assimilados pelas leveduras. Parte desses aminoácidos assimilados são excretados em quantidades significativas, mas variáveis de diferentes aminoácidos no final da fermentação, existindo algumas centenas de miligramas de aminoácidos por litro, sendo que a prolina geralmente pode representar metade destes aminoácidos (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Quando as concentrações de YAN estão baixas, podem levar a fermentações lentas ou paragens de fermentação e um aumento na formação de sulfeto de hidrogênio - H₂S (odor de ovos podres). A explicação para este facto pode residir no facto de que com o decorrer da fermentação alcoólica, as fontes de azoto no mosto vão diminuindo até chegar à exaustão, levando a uma paragem na síntese de proteínas, causando uma diminuição drástica na atividade de transporte de açúcar e conseqüente diminuição na taxa de produção de CO₂.

Como forma de prevenir a inativação do transporte de glicose, é preciso manter uma alta taxa de síntese protéica, podendo esta ser feita mantendo um suprimento de amônio amplo, antes da diminuição do YAN.

Outros dois mecanismos podem explicar a diminuição nas taxas de fermentação, relacionadas à falta de uma fonte de azoto. O primeiro mecanismo está relacionado com a desativação da enzima chave fosfofructoquinase pela falta do composto amônia, que

é um ativador alostérico da fosfofructoquinase. O segundo mecanismo está relacionado também com a desativação da enzima chave fosfofructoquinase, à medida que se tem uma diminuição no suprimento de amônia, a via de sinalização induzida pela presença de açúcar fermentável é diretamente afetada, reduzindo desta forma as taxas de fermentação (Alexandre & Charpentier, 1998).

Concentrações mais altas de YAN podem aumentar a turbidez, causar uma instabilidade microbiana e promover a produção de aromas anormais (Burin et al., 2015; Prior et al., 2019; Mendes-Ferreira et al., 2011; Sturgeon et al., 2013).

Mesmo com todas tecnologias atuais ainda é difícil prever o motivo exato de uma fermentação parar, sendo assim, atualmente muitos produtores de vinho optam por adicionarem suplementos nutricionais tendo como diretriz a concentração inicial de azoto assimilável por leveduras (YAN) (Prior et al., 2019; Specht, 2010).

2.3.1. Compostos azotados nas uvas, no mosto e no vinho

Ao decorrer da maturação, ocorre uma grande quantidade de fenômenos e alterações nas uvas, a partir da fase do “pintor” vários compostos serão acumulados, transformados e sintetizados. A acumulação de açúcares e minerais, a síntese de compostos fenólicos e a evolução dos compostos azotados e precursores do aroma, é somente uma pequena parte das inúmeras reações que podem ocorrer (Magalhães, 2010; Conde et al., 2007).

Vários fatores, como, uso de adubos, variedades da uva, adição de suplementos na adega, infecção por *Botrytis cinerea* (que consome grandes quantidades de nutrientes que podem ser assimilados pelas leveduras *Saccharomyces*), clima, região, momento da colheita, podem interferir no teor em compostos azotados, especialmente em mostos de uvas brancas (Aranda et al., 2011; Soufleros et al., 2003)

Segundo Ribéreau-Gayon et al., (2006); Magalhães, (2010), as substâncias azotadas são transportadas através do xilema e do floema para a uva, principalmente nas formas de catião de amônio ou aminoácidos.

Ao evoluir a maturação das uvas as formas de azoto encontradas vão se modificando, passando a ter as seguintes constituições (Magalhães, 2010):

- Azoto inorgânico (mineral ou amoniacal): Pode ser encontrado na forma de sais de amônia (3% - 10%), como DAP (fosfato de diamônio) ou sulfato de amônia.
- Azoto orgânico (α -amino): É constituído pelos aminoácidos livres com exceção da prolina que não é assimilada pelas leveduras. Sendo dividida em três frações distintas:
 - Azoto amínico, com cerca de (25% - 30%) de aminoácidos.
 - Azoto polipeptídico, com cerca de (25% - 40%) de polipeptídeos.
 - Azoto proteico, com cerca de (5% - 10%) de proteínas.

O mosto de uvas maduras contém aproximadamente apenas 20% do total do azoto total do bago, sendo que, o restante fica retido nas peles e nas grainhas, que liberam formas solúveis de azoto (catiões e aminoácidos) na polpa durante o final da maturação. Em fermentações com maceração pelicular, se tem maior extração destes compostos azotados. Podem estar presentes diversas formas orgânicas, entre elas os aminoácidos, oligopeptídeos e polipéptidos, proteínas, amidas e em menores quantidades, nitratos, nucleotídeos, aminas e vitaminas (Specht, 2010; Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Aranda et al., 2011).

2.3.2. Azoto Amoniacal (inorgânico)

O azoto amoniacal (inorgânico) é encontrado na forma de sais de amônia, como DAP ou sulfato de amônia, tem como função de suplementar os mostos pobres em compostos azotados e aumentar a disponibilidade de azoto na produção de vinho.

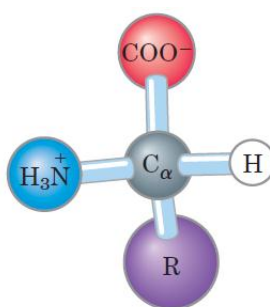
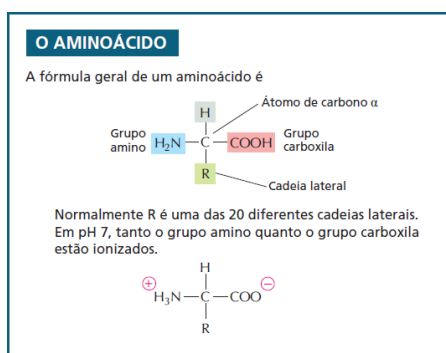
A suplementação com azoto inorgânico pode não obter os melhores resultados satisfatórios na fermentação, sendo que o uma suplementação acima do necessário pode levar ao desenvolvimento de alguns caracteres agressivos no vinho (Specht, 2010).

2.3.3. Azoto orgânico

A importância do azoto orgânico é bem conhecida como uma fonte altamente eficiente de nutrientes para leveduras de vinho, especialmente quando comparada ao azoto inorgânico do fosfato de diamônio (DAP). Os aminoácidos contidos nas uvas são predominantemente prolina, arginina e glutamina. A suplementação dos mostos com azoto orgânico, pode ser feita com os aminoácidos e peptídeos provenientes de leveduras inativadas (Specht, 2010).

2.3.4. Aminoácidos (AA)

Os aminoácidos como mostrado na Figura 1 são unidades químicas orgânicas de baixo peso molecular, existem 20 tipos de aminoácidos comuns denominados α -aminoácidos, que possuem um átomo de carbono assimétrico (C_{α}), exceto a glicina, com pelo menos um grupo amina (NH_2) e um grupo ácido carboxílico ($COOH$) ligados ao mesmo átomo de carbono. Possuem cadeias laterais ou grupos R e um átomo de hidrogênio que os difere uns dos outros. (Nelson, D.L 2014; Campbell, 2007). Compõem, junto com as proteínas e peptídeos, cerca de 30 a 40% do N total (Soufleros, et al., 2003).



Estrutura geral de um aminoácido.

Esta estrutura é comum a todos os tipos de α -aminoácidos, exceto um (a prolina, aminoácido cíclico, é a exceção). O grupo R, ou cadeia lateral (roxo), ligado ao carbono α (cinza) é diferente em cada aminoácido.

Figura 1: Estrutura geral de um aminoácido (Fonte: Bruce Alberts et al., 2017; Nelson, 2014)

Os aminoácidos podem ser classificados de acordo com algumas propriedades química do grupo R (cadeias laterais), particularmente sua polaridade ou tendência para interagir com a água em pH biológico (próximo do pH 7,0), portanto podem ser ácidas (ácido glutâmico, ácido aspártico) e básicas (arginina, histidina e lisina), polares não carregadas (Serina, Treonina, Cistéina, Asparagina e Glutamina), apolares (Glicina, Alanina, Prolina, Valina, Leucina, Isoleucina e Metionina), aromáticos (Fenilalanina, Tirosina e

Triptofano). Esses aminoácidos recebem abreviação tanto de uma como de três letras como mostrado na Tabela 1 (Alberts et al., 2017; Nelson, 2014).

Aminoácidos	Abreviaturas
Alanina	Ala
Arginina	Arg
Alanina Asparagina	Asn
Ácido Aspártico	Asp
Cisteína	Cis
Ácido Glutâmico	Glu
Glutamina	Gln
Glicina	Gli
Histidina	His
Isoleucina	Ile
Leucina	Leu
Lisina	Lis
Metionina	Met
Fenilalanina	Fen
Prolina	Pro
Serina	Ser
Treonina	Tre
Triptofano	Tri
Tirosina	Tir
Valina	Val

Tabela 1: Nomes e abreviações dos 20 aminoácidos comuns (Adaptado de: (Campbell & Farrel,2007)).

Segundo Alberts et al., (2017) os aminoácidos se unem por ligações peptídicas, formando longos polímeros (polímeros naturais) que dão origem as proteínas.

Dentre uma infinidade de aminoácidos existentes nos organismos, apenas 20 formam um conjunto, que são comumente encontrados em proteínas (Campbell & Farell, 2007; Nelson, 2014).

As proteínas fazem parte de cada organismo, desde bactérias aos seres humanos, e controlam praticamente todos os processos que ocorrem em uma célula, possuindo uma diversidade de funções, como estruturais (ex: crescimento das paredes celulares), transportadora (ex: hemoglobina) e etc (Nelson, 2014).

Nos mostos os aminoácidos são os principais componentes da fração azotada, representando cerca 60 a 90% do teor de nitrogênio total mostos de uva (Rapp & Versini, 1995).

Os aminoácidos livres em mostos servem como fonte de nutrientes azotados para leveduras em fermentação alcoólica e para bactérias lácticas em fermentação malolática, são considerados também como uma fonte de precursores de compostos aromáticos, devido aos subprodutos formados do metabolismo de aminoácidos na levedura (como acetato de isoamil, ácido isovalérico e ácido isobutírico e seus ésteres etílicos, álcoois superiores e metionol) (Conde et al., 2007; Moreno-Arribas & Polo, 2009; Ferreira et al., 2000).

Os principais aminoácidos existentes no vinho encontram-se na Figura 2:

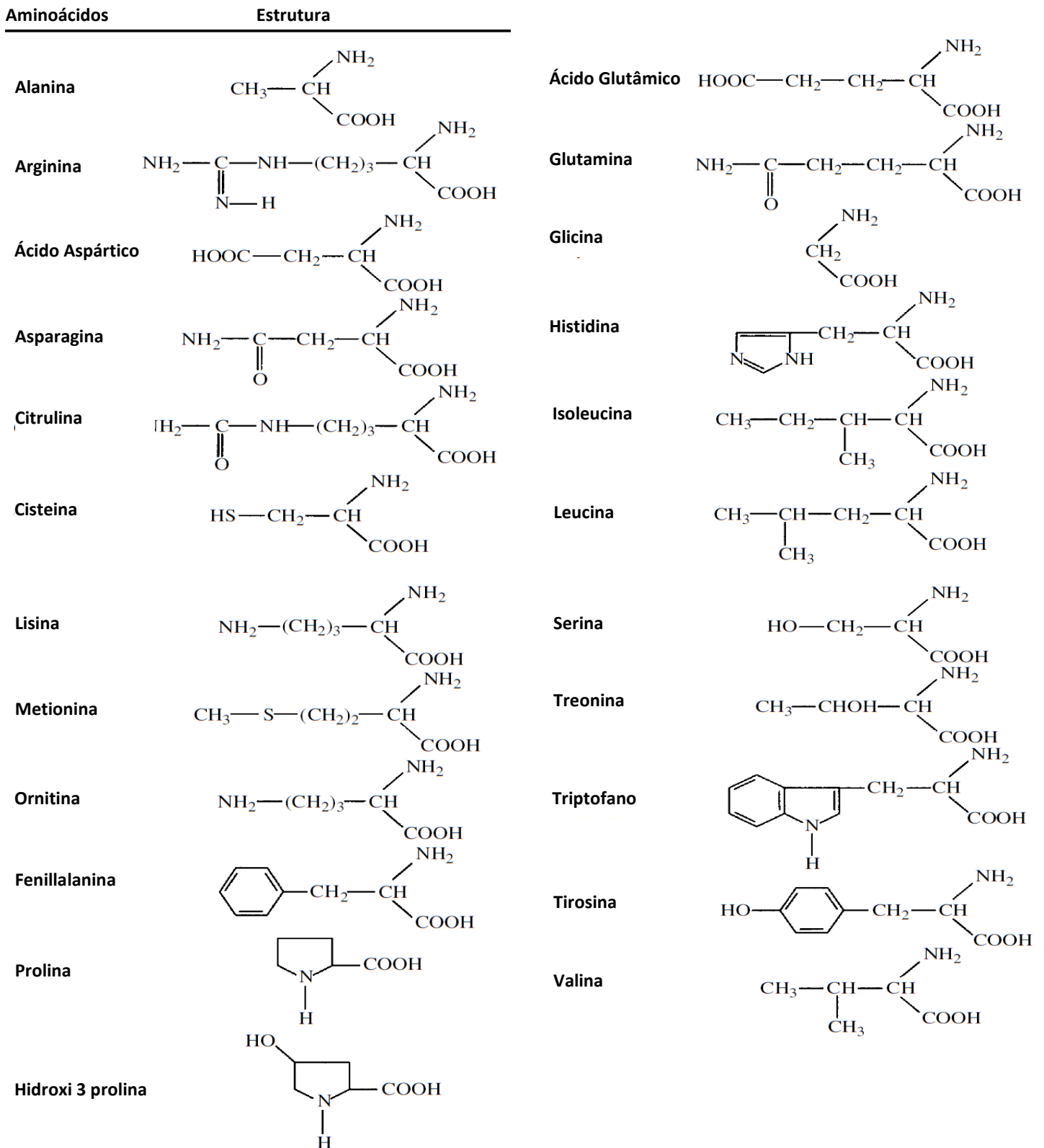


Figura 2: Principais aminoácidos no vinho (Adaptado de: (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

A alanina e a arginina são os aminoácidos mais encontrados no mosto (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

A prolina também é um dos principais aminoácidos encontrados no mosto, mas este não é utilizado pelas leveduras durante a fermentação (Aranda et al., 2011).

Segundo Fairbairn et al., (2017); Prior, (2019); Rapp & Versini, (1995) os diferentes aminoácidos possuem intensidades de metabolização diferentes pelas leveduras, sendo que: glutamina, asparagina, serina, ácido glutâmico, ácido aspártico e arginina constituem uma fonte preferencial para crescimento das leveduras e todos os outros sendo intermediários ou não preferíveis.

A composição e concentração dos aminoácidos, nas uvas e no mosto são factores muito importantes na diferenciação e autenticidade dos vinhos (Burin et al., 2015; Fairbairn et al., 2017).

3. Identificação e quantificação de aminoácidos no vinho

Muito já se estudou sobre a importância do azoto assimilável para o crescimento e o metabolismo das leveduras e as causas da deficiência e do excesso, bem como o papel na formação do bouquet do vinho (Jiranek, 1995; Moreno-Arribas & Polo, 2009; Rapp & Versini, 1995).

A cromatografia líquida (CL) é uma técnica analítica que nos permite separar os constituintes de uma determinada mistura (amostra). A separação ocorre quando a mistura atravessa a fase estacionária (coluna), com o auxílio da fase móvel (solventes orgânicos ou aquosos, por exemplo). Existe uma grande variabilidade de possíveis combinações entre a fase móvel e estacionária. À saída da coluna os compostos passam por um detector gerando-se um gráfico chamado “cromatograma” (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Quando temos o equipamento de cromatografia líquida acoplados com detectores de massas ou detector de diodos estes fornecem também informações importante para a identificação de cada composto, juntamente com os tempos de retenção. A utilização de padrões é também uma grande ajuda para a identificação dos compostos.

Com a melhoria das tecnologias surgiu o HPLC que é uma forma moderna de CL, onde se usa colunas de partículas pequenas através das quais a fase móvel é bombeada a alta pressão (Dong, 2006).

4. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

4.1. Princípios básicos

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC- High Performance Liquid Chromatography), antes chamada de (HPLC- High Pressure Liquid Chromatography), é uma das técnicas mais utilizadas da química analítica. O processo tem a capacidade de separar e quantificar os compostos que estão presentes em qualquer amostra, desde que essa possa ser dissolvida em uma solução (Waters, 2017).

O método possui uma grande sensibilidade, dependendo do detetor, tem uma fácil adaptação para determinações quantitativas e uma boa adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis, além disso, possui ampla aplicabilidade a vários compostos de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência. Dentre estes compostos podemos ter como exemplo: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, pesticidas e muitos outros compostos (Skoog, Holler, & Crouch, 2016).

O sistema de HPLC tem como característica o uso de colunas em aço inoxidável com diâmetro interno entre 2-5 mm, existem diferentes tipos de materiais para se empacotar uma coluna, são empacotadas com partículas porosas esféricas de tamanho muito pequeno, 3-10 μm , que constituem a fase estacionária (Meyer, 2004).

Durante o processo a fase móvel passa continuamente pela coluna, o fluxo e a pressão são controlados. Uma maior eficiência do método se consegue com o uso de pressões elevadas, permitindo assim uma maior eficiência das análises, além disso com o uso de colunas desenvolvidas com micropartículas, a separação dos compostos terá uma maior eficiência (Meyer, 2004).

Os compostos de uma amostra são separados, quando ocorre a passagem da mistura transportada pela fase móvel, pela fase estacionária, esta separação só é possível devido a cada componente da mistura interagir de forma diferenciada com o material sorvente, gerando diferentes velocidades para cada componente e levando à separação conforme eles percorrem a coluna. Há diferentes tipos de enchimento que uma coluna cromatográfica pode conter, influenciando na afinidade entre a amostra e a fase estacionária (Rocha, 2015).

No método de HPLC é utilizado um termo chamado tempo de retenção (t_R) ilustrado na Figura 3, que se define como sendo, o tempo que demora para a substância juntamente com a fase móvel, atravessar a coluna (fase estacionária) e a atingir o detector formando um pico no cromatograma. O tempo de retenção pode sofrer variações

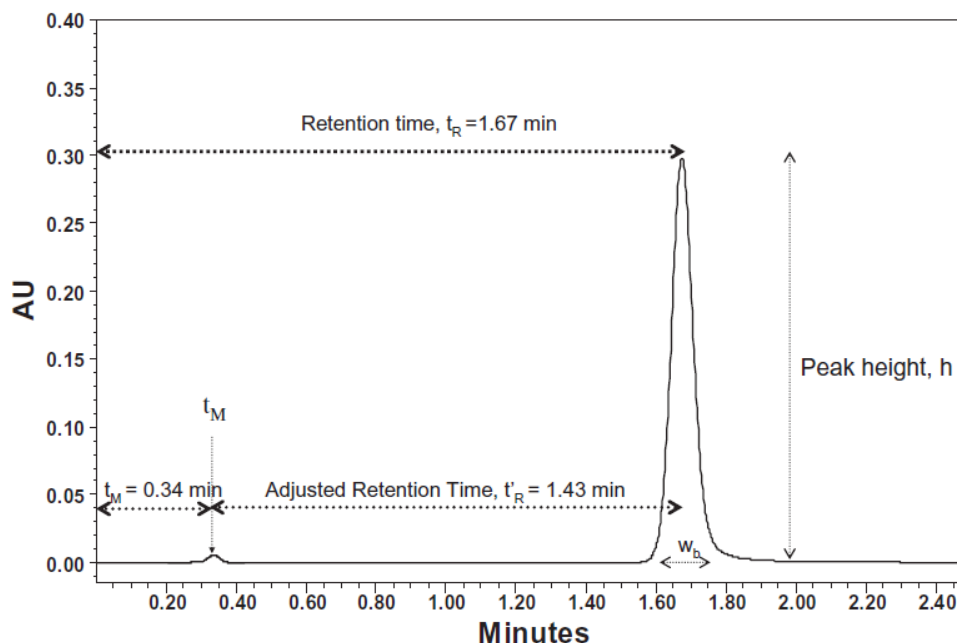


Figura 3: Gráfico ilustrativo do tempo de retenção (Fonte: Kazakevich & Lobrutto, 2007) com o fluxo, o comprimento e o diâmetro da coluna e com os solventes utilizados como eluentes. (Dong, 2006).

A afinidade da amostra com as fases móvel e estacionária, influencia significativamente o método de separação, podendo este ser afetado tanto na seletividade como na eficiência de separação dos compostos de interesse, sendo um dos passos importantes no desenvolvimento de um método cromatográfico. As diferentes interações que ocorrem na coluna cromatográfica podem ser classificadas como: partição, adsorção, exclusão ou troca iônica.

Divide – se em 2 grupos a separação por partição: partição em fase normal (NP-HPLC) ou partição em fase reversa (RP-HPLC). A divisão entre NP-HPLC e RP-HPLC está relacionada com a polaridade das fases de separação do sistema. Na fase normal (NP-HPLC) a fase estacionária é polar e a fase móvel é apolar, neste caso o componente menos polar é eluído primeiro, aumentando a polaridade da fase móvel diminui então o tempo de eluição. Na RP-HPLC, a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar, o

componente mais polar elui primeiro, e aumentar a polaridade da fase móvel aumenta o tempo de eluição (Harris, 2012; Skoog, Holler, & Crouch, 2016).

Se na separação for utilizada um único solvente (ou mistura de solventes constante), se dá o nome de eluição isocrática. Caso o solvente não fornecer eluição suficientemente rápida de todos os componentes, então se utiliza a eluição gradiente, que consiste, em adicionar quantidades crescentes de solvente B ao solvente A para criar um gradiente contínuo (Harris, 2012).

O sistema de HPLC está geralmente interligado a um computador, onde os dados das análises são processados gerando um gráfico (cromatograma), a leitura do gráfico vai nos permitir determinar a área do pico formado para cada composto detectado e posteriormente fazer sua quantificação a partir de retas de calibração, indicando a presença dos analitos que foram identificados pelo detetor, bem como suas concentrações (Waters, 2017).

O sistema HPLC é constituído por vários componentes, dentre eles a bomba, o injetor, a coluna, o detetor e o sistema de registo e processamento de dados, como mostra na figura 4 (Skoog, Holler, & Crouch, 2016).

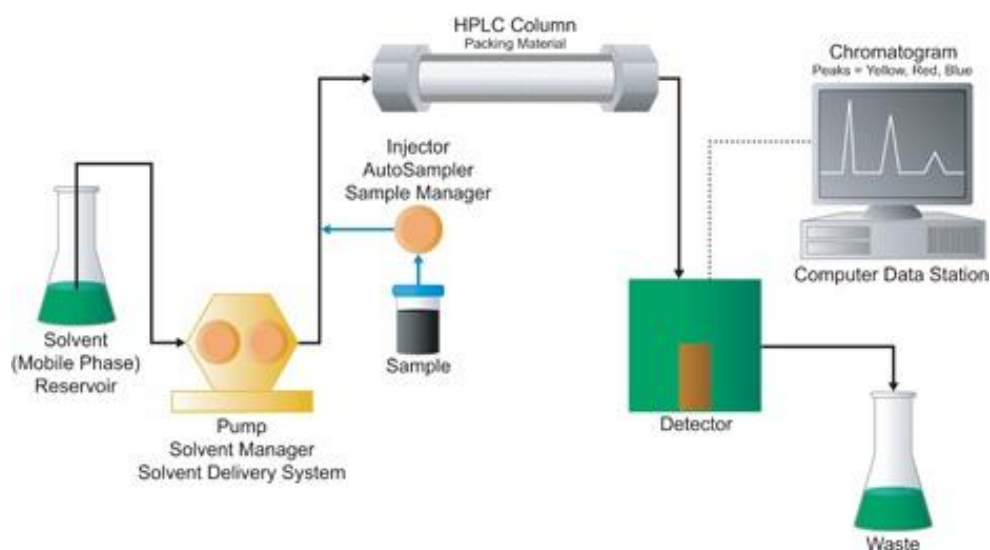


Figura 4: Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência [HPLC] (Adaptado de: (Waters 2017)).

O injetor tem como função introduzir a amostra na fase móvel, que a seguir será introduzida na coluna do sistema de cromatografia líquida, dando início no processo de separação cromatográfica. A maioria dos aparelhos de HPLC modernos operam de

forma *autosampler*, desta forma é possível realizar uma programação contínua de injeções automáticas das amostras (Porto, 2014).

A distribuição da fase móvel pela coluna cromatográfica é feita com auxílio de uma bomba, que fornece o fluxo constante e contínuo da fase móvel através do sistema (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

A coluna pode ser considerada como o coração do sistema HPLC, nela ocorre realmente a separação dos compostos da amostra. A amostra é “arrastada” pela fase móvel sobre a fase estacionária, neste processo, os diversos componentes da mistura serão separados de acordo com suas propriedades de solubilidade e adsorção para a seguir passarem pelo detetor (Kazakevich & Lobrutto, 2007; Pinho, 2016).

O detetor é o dispositivo que irá fazer o registro contínuo de propriedades físicas (às vezes químicas) específicas do efluente da coluna, controlando a sensibilidade com que cada composto irá se detetado e medido (Kazakevich & Lobrutto, 2007; Sequeira, 2012).

Os detetores podem ser de vários tipos, entre eles os de, ultravioleta (UV), índice de refração (IR), espectrometria de massa (MS), *Diode Array* (DAD) e fluorescência (FL) (Sequeira, 2012). Sendo que o DAD é o mais comumente utilizado para registrar os espectros de absorção ultravioleta e visível (UV-vis), este tipo de detetor tem como vantagem a capacidade de selecionar o melhor comprimento de onda para análise. Quando o composto chega na célula de fluxo do detetor ele causa uma alteração da absorbância. Se o composto absorver mais do que a fase móvel, um sinal positivo é obtido (Kazakevich & Lobrutto, 2007; Skoog, Holler, & Crouch, 2016).

4.2. Derivatização

A derivatização química pré ou pós-coluna tem por objetivo, aumentar a seletividade e a sensibilidade de detecção durante uma análise por HPLC (Proestos et al., 2008). Devido os aminoácidos e aminas biogénicas não possuírem um cromóforo específico e as suas diferentes estruturas, é difícil fazer sua análise direta, sendo necessário realizar a derivatização para modificar quimicamente o composto, facilitando a sua detecção (Arrieta and Prats-Moya, 2012; Wang et al., 2014).

A derivatização pode ser realizada normalmente de duas formas: antes (pré-coluna) ou após a separação cromatográfica dos aminoácidos (pós-coluna), sendo que raramente na coluna (Callejón et al., 2010).

Existem vários agentes de derivação diferentes e cada um apresenta suas vantagens e desvantagens (Callejón et al., 2010). Neste presente trabalho foi utilizado o agente de derivatização DEEMM (dietil etoximetilenomalonato), é um agente de derivatização de pré-coluna que apresenta como as seguintes vantagens: reage com aminoácidos primários e secundários, derivação direta sem preparação prévia, a boa estabilidade dos derivados de aminoenona produzidos, a simplicidade de seu uso e a ausência de subprodutos pós-reação e o excesso de reagente não interfere (Callejón et al., 2010; Wang et al., 2014; Redruello et al., 2012).

4.3. Padrão Interno

O uso de padrões internos (PI) no método de HPLC tem como objetivo aumentar a precisão das análises, corrigindo perdas de compostos no decorrer do processo e que podem induzir a variações cromatográficas. É um composto químico, normalmente com estrutura análoga ao composto a quantificar, durante o procedimento é introduzida uma quantidade do PI conhecida e igual para todas as amostras. Para se analisar os cromatogramas é utilizado como parâmetro analítico a razão entre as áreas do pico do composto e do pico do padrão interno. É esperado que o pico do padrão interno seja bem distinto dos picos dos outros compostos da amostra (Silva, 2012).

5. Metodologia

5.1. Ensaio e Vinificações

As microvinificações utilizadas na realização deste experimento foram executadas na vindima de 2018, utilizando a casta branca Arinto.

As uvas foram prensadas com os cachos inteiros sem serem desengaçados e o mosto distribuído entre 24 barricas de carvalho francês (2º uso), foram formados 4 grupos de 6 barricas cada. Cada grupo recebeu um respetivo tratamento, foi utilizado 3 leveduras comerciais de vinho, suas referências (correspondentes a nomes comerciais) foram: QA23, EC1118, CY3079 e uma fermentação espontânea (Leveduras indígenas). As leveduras utilizadas foram escolhidas pela disponibilidade destas durante a realização do experimento. Foram utilizadas doses recomendadas pelo fabricante para inoculação de cada levedura. A ficha técnica de cada levedura se encontra no anexo.

- 6 barricas inoculadas com levedura QA23 (*Saccharomyces cerevisiae bayanus*)
- 6 barricas inoculadas com levedura EC1118 (*Saccharomyces cerevisiae, var bayanus*)
- 6 barricas inoculadas com levedura CY3079 (*Saccharomyces cerevisiae, var cerevisiae*)
- 6 barricas com fermentação espontânea (leveduras indígenas)

5.2. Caracterização físico-química dos vinhos

Para as 24 amostras analisaram-se alguns parâmetros enológicos, tais como:

- pH
- Acidez Total
- Acidez Volátil
- SO₂ Livre
- SO₂ Total
- Teor Alcoólico

Avaliação do perfil em aminoácidos em vinho branco fermentado com leveduras *Saccharomyces* e leveduras indígenas

Abaixo nas Figuras 5, 6 e 7 está ilustrado algumas amostras e equipamentos utilizados para as análises.



Figura 5: Algumas das amostras analisadas.

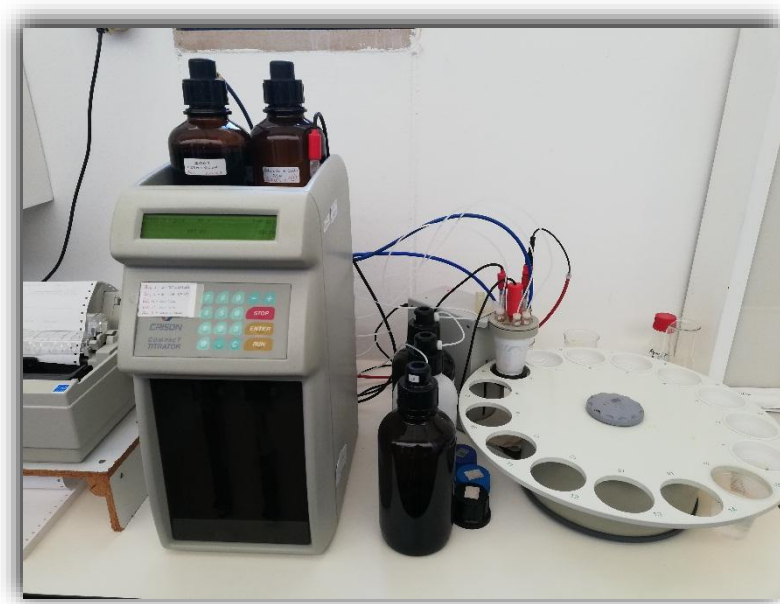


Figura 6: Potenciômetro utilizado nas análises.



Figura 7: Análise de acidez volátil.

Todas as análises realizadas foram feitas no laboratório de enologia da Universidade de Évora (Mitra), onde se seguiu os protocolos utilizados no mesmo.

5.3. Identificação e quantificação de aminoácidos por HPLC-DAD

5.3.1. Aminoácidos analisados

Neste experimento foram estudados 21 aminoácidos, estando estes descritos na Tabela 2.

Aminoácidos	
Ácido Aspártico	Isoleucina
Ácido Glutâmico	Lisina
Alanina	Leucina
Arginina	Metionina
Asparagina	Ornitina
Cisteína	Prolina
Fenilalanina	Serina
GABA	Tirosina
Glicina	Treonina
Glutamina	Valina
Histidina	

Tabela 2: Aminoácidos estudados neste experimento

5.3.2. Preparação dos padrões

Foi preparada uma “solução-mãe” contendo uma quantidade conhecida de cada um dos aminoácidos em estudo. Esta solução foi preparada em HCl 0.1 N. Posteriormente foram efectuadas diluições, numa gama de concentrações entre 300 mg/L e 20 mg/L para todos os aminoácidos exceto a prolina que variou entre 1000 mg/L e 100 mg/L.

Os padrões sofreram o mesmo processo de derivação que as amostras de vinho.

5.3.3. Preparação das amostras

Foram realizadas três réplicas de cada amostra de vinificação para análise, sendo que para cada um se preparou em tubos de vidro, uma reação de derivatização, a qual está presente na Tabela 3.

Volume	Reagente
1,75 mL	Tampão Borato
750 µL	Metanol
1 mL	Amostra
20 µL	Ácido 2-aminoadípico, 1 g/L (Padrão Interno)
30 µL	DEEMM (Agente Derivatizante)
Agitar suavemente	
Ultra-sons (30 min)	
Estufa (2h, a 70 °C)	

Tabela 3: Reação de derivatização.

Preparou-se também um branco, no qual se substituiu a amostra por 1 mL de HCl 0.1 N. Após este processo, as amostras foram filtradas, através de filtros de membrana de 0,45 µm, para vials de HPLC. A seguir colocou-se os vials no aparelho de HPLC respectivo e prosseguiu-se com a análise.

Na Figura 8 está ilustrado os materiais utilizados na preparação das amostras.



Figura 8: Filtração das amostras para tubos de HPLC.

5.3.4. Condições de quantificação de aminoácidos por HPLC-DAD

As análises cromatográficas foram feitas com o equipamento de HPLC Alliance Waters, equipado com detetor DAD e software Empower, como mostra Figura 9.

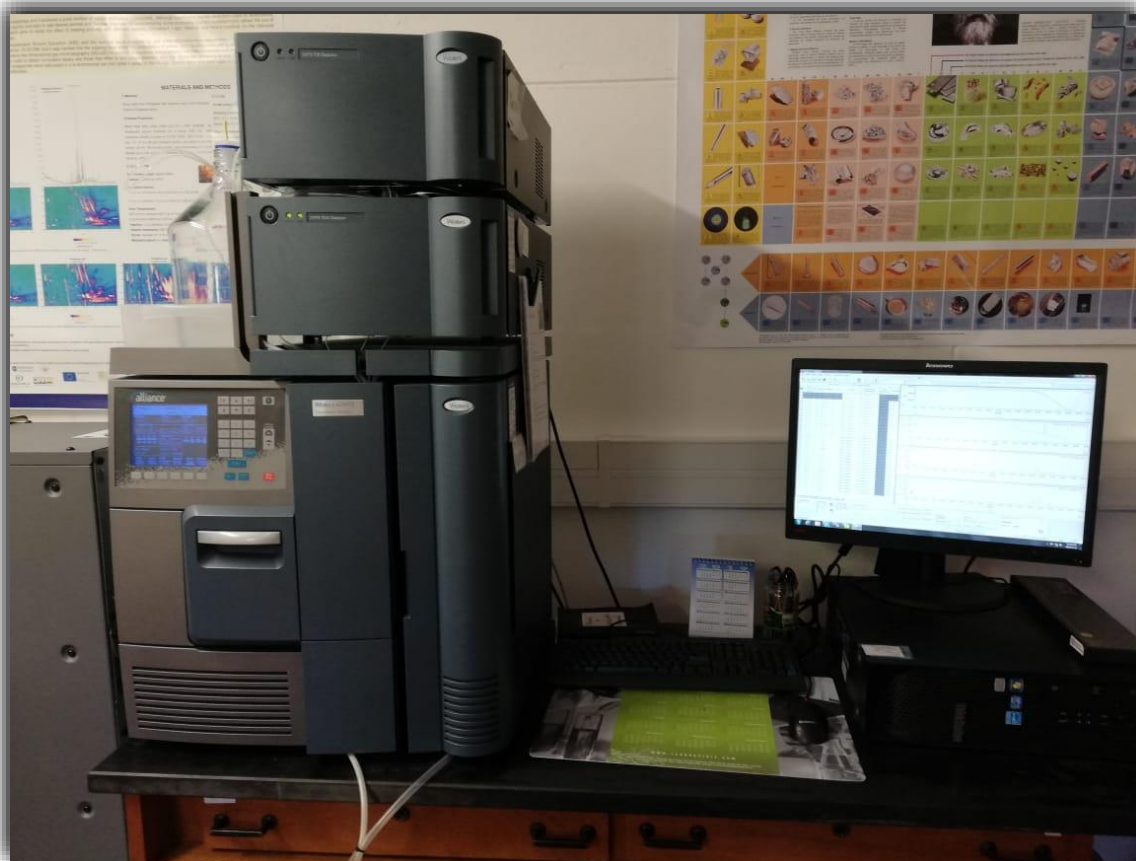


Figura 9: HPLC Alliance Waters (Mitra).

Foi utilizado um método adaptado de Gómez-Alonso, et al (2007). A fase estacionária consistiu numa coluna de fase reversa ACE C18-HL (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m). A fase móvel teve como eluente A um tampão acetato 25 mM (pH 5.8) com 0,4 g de azida de sódio e o eluente B uma mistura de acetonitrilo e metanol, com uma proporção de 4:1 (v/v). O fluxo foi de 0,9 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 50 μ L, sendo a injeção feita de forma automática. As condições da análise estão apresentadas na Tabela 4.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	90	10
20	90	10
30	83	17
30.01	81	19
31	81	19
31.01	80.5	19.5
39.51	77	23
60.11	70.6	29.4
68.11	28	72
73.11	18	82
77.11	0	100
80.11	0	100
85.11	90	10
90	90	10

Tabela 4: Condições da análise de HPLC.

A detecção foi feita com um detetor Diode Array, utilizando os comprimentos de onda 269, 280 e 300 nm.

A utilização de um detetor DAD nos permite selecionar os melhores comprimentos de onda para a análise real, além disso, tem uma vantagem que está relacionada a sobreposição dos picos no cromatograma. Muitas vezes a forma do pico em si não revela que realmente corresponde a um, dois (ou até mais) componentes, podendo estar sobrepostos, sendo assim, esta limitação de absorvância em vários comprimentos de onda é particularmente útil para decidir se o pico representa um único composto ou se possui mais de um composto.

A identificação dos aminoácidos foi conseguida comparando com o tempo de retenção do respectivo padrão.

Para se fazer a quantificação foi utilizado as retas de calibração para o respectivo padrão.

6. Análise estatística dos resultados

Todos os resultados apresentados foram expressos como média \pm desvio padrão. No tratamento estatístico dos dados experimentais obtidos recorreu-se ao auxílio do programa IBM SPSS® Statistics v25.

Com o objetivo de avaliar a existência de diferenças significativas entre os valores experimentais obtidos recorreu-se à análise de variância (ANOVA) e análise discriminante canônica (CDA), que é uma técnica para redução de dimensão, relacionada à análise de componentes principais e correlação canônica. As funções discriminantes são combinações de variáveis que melhor discriminam grupos definidos *à priori*. Neste trabalho considerámos a existência de 4 grupos de vinhos, quando baseados no tipo de levedura utilizado (1 – EC1118, 2 – CY3079, 3 – QA23, 4 - Nativas). Neste trabalho, a ANOVA foi sempre efetuada com um nível de significância $<0,05$, correspondente a um grau de confiança de 95%.

7. Resultados e discussão

7.1. Caracterização físico-química dos vinhos

Para compreender melhor os vinhos que foram utilizados neste ensaio, foram feitas análises físico-químicas de rotina para as 24 amostras das vinificações. Analisou-se alguns parâmetros enológicos como: SO₂ Livre, SO₂ Total, teor alcoólico, acidez total, acidez volátil e pH, estando os resultados presentes na Tabela 5, apresentando-se o valor médio \pm DP, o valor mínimo e o valor máximo encontrados.

Leveduras	SO ₂ Livre \pm DP (mg/dm ³)	SO ₂ Total \pm DP (mg/dm ³)	Teor Álcool \pm DP (% vol)	Ac. Total \pm DP (Ác. Tart. g/dm ³)	Ac. Volátil \pm DP (Ác. Acét. g/dm ³)	pH \pm Dp
1 (EC1118)	5 \pm 2,19 (4 – 11)	25,5 \pm 7,06 (13 – 33)	13,8 \pm 0,16 (13,5 – 13,9)	6,76 \pm 1,03 (5,91 – 8,94)	0,49 \pm 0,17 (0,39 – 0,66)	3,06 \pm 0,07 (3,0 – 3,21)
2 (CY3079)	5 \pm 0,57 (4 – 6)	16,5 \pm 2,85 (14 – 22)	13,6 \pm 0,03 (13,5 – 13,6)	7,40 \pm 0,38 (7,26 – 8,11)	0,46 \pm 0,09 (0,39 – 0,66)	3,07 \pm 0,01 (3,05 – 3,10)
3 (QA23)	5 \pm 0,47 (4 – 5)	23 \pm 7,79 (11 – 34)	13,6 \pm 0,09 (13,6 – 13,8)	7,07 \pm 0,83 (6,75 – 8,75)	0,48 \pm 0,05 (0,42 – 0,57)	3,06 \pm 0,04 (2,99 – 3,08)
4 (Nativas)	5 \pm 0,37 (4 – 5)	21 \pm 1,86 (18 – 21)	13,5 \pm 0,19 (13,1 – 13,7)	6,64 \pm 0,42 (5,50 – 6,75)	0,66 \pm 0,04 (0,69 – 0,57)	3,14 \pm 0,05 (3,12 – 3,27)

Tabela 5: Valores médios (\pm DP) dos parâmetros enológicos analisados.

As amostras foram coletadas após o término da fermentação alcoólica das vinificações e posterior análise. O facto dos valores de SO₂ estarem baixos se justifica, porque só foi adicionado SO₂ durante a prensagem, e na altura da coleta das amostras o teor de SO₂ ainda não havia sido corrigido. Levando em conta que o estudo foi feito com vinho de casta branca, o teor alcoólico dos vinhos foi relativamente alto. Nos vinhos analisados todos os valores para acidez total foram superiores ao que se tem como base, que é superior ou igual a 3,5 g/dm³ (expressa em ácido tartárico Hat), estes vinhos não sofreram nenhuma correção de acidez nos mostos.

A acidez volátil de todos os vinhos analisados foi abaixo aos parâmetros estabelecidos, que tem de ser igual ou inferior a 1,2 g/dm³ (expressa em ácido acético - Hac).

7.2. Quantificação dos aminoácidos nos vinhos e teste ANOVA

As quantificações dos aminoácidos foram feitas a partir dos cromatogramas referentes ao comprimento de onda de 280 nm. Para se fazer a quantificação de cada aminoácido foram utilizadas retas de calibração de cada um deles, que foram elaboradas a partir de padrões que continham concentrações conhecidas dos mesmos.

Na Tabela 6 estão apresentados os tempos de retenção de cada aminoácido \pm desvio padrão, e ainda a equação da reta obtida para cada composto, que foi utilizada para o cálculo das concentrações de cada amostra, bem como o respectivo coeficiente de correlação (R^2).

AA	Tempo de retenção (min) \pm DP	Equação da reta ($y = mx - b$)	R^2
1 - Ácido Aspártico	4,12 \pm 0,02	$y = 0,0233x - 0,462$	0,9961
2 - Ácido Glutâmico	7,06 \pm 0,02	$y = 0,0235x - 0,4427$	0,998
3 - Asparagina	12,37 \pm 0,03	$y = 0,0235x - 0,4326$	0,9981
4 - Serina	15,14 \pm 0,01	$y = 0,0337x - 0,6507$	0,9973
5 - Histidina	16,42 \pm 0,02	$y = 0,0209x - 0,4059$	0,9975
6 - Glutamina	17,34 \pm 0,04	$y = 0,0306x - 0,6769$	0,9975
7 - Glicina	18,11 \pm 0,03	$y = 0,0445x - 0,8511$	0,9971
8 - Treonina	28,54 \pm 0,06	$y = 0,0479x - 0,9183$	0,9978
9 - Arginina	30,04 \pm 0,04	$y = 0,0157x - 0,3018$	0,9979
10 - Alanina	34,52 \pm 0,02	$y = 0,0377x - 0,6828$	0,9972
11 - GABA	34,79 \pm 0,02	$y = 0,0323x - 0,6016$	0,9973
12 - Prolina	36,68 \pm 0,03	$y = 0,0041x - 0,0334$	0,9981
13 - Tirosina	39,86 \pm 0,01	$y = 0,0137x - 0,132$	0,9981
14 - Valina	46,37 \pm 0,02	$y = 0,0292x - 0,531$	0,9973
15 - Metionina	48,95 \pm 0,04	$y = 0,0227x - 0,4416$	0,9972
16 - Cisteína	50 \pm 0,02	$y = 0,006x - 0,0974$	0,9971
17 - Isoleucina	55,70 \pm 0,03	$y = 0,0256x - 0,4807$	0,9973
18 - Leucina	58,04 \pm 0,02	$y = 0,0229x - 0,433$	0,998
19 - Fenilalanina	59,45 \pm 0,05	$y = 0,0256x - 0,5408$	0,9978
20 - Ornitina	64,66 \pm 0,04	$y = 0,0555x - 1,0676$	0,9976
21 - Lisina	66,64 \pm 0,03	$y = 0,034x - 0,624$	0,9981

Tabela 6: Tempo de retenção e equação das retas de calibração para cada aminoácido.

Na figura 10 apresenta-se como exemplo um dos cromatogramas obtidos, onde se pode observar para cada tempo de retenção, o pico correspondente a cada aminoácido. A sua identificação encontra-se na tabela 6.

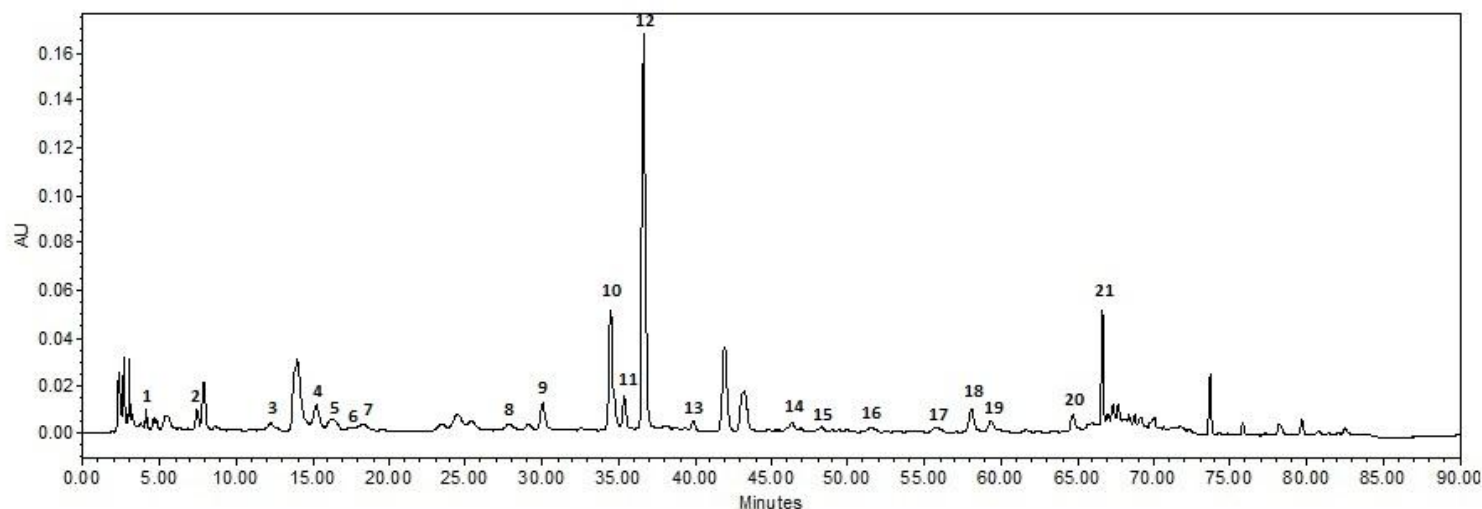


Figura 10: Cromatograma no c.d.o de 280 nm referente a uma amostra.

Os resultados do teste ANOVA foram analisados e pode-se verificar que, para cada um dos aminoácidos (Glu, Ser, Asn, Gli, Arg, Ala, Gln, Met, Prol) a concentração média entre as respetivas leveduras diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de significância. Construiu-se um gráfico para cada um desses aminoácidos e estão representados nos Gráficos 1 a 6, a fim de visualizar melhor os resultados e verificar eventuais diferenças entre as amostras dos ensaios que tiveram diferenças significativas.

A análise dos resultados do teste ANOVA para os aminoácidos (Asp, His, Tre, GABA, Tir, Val, Cis, Ile, Leu, Fen, Orn e Lis), permitiu verificar que, a concentração média destes aminoácidos entre as respetivas leveduras não difere estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de significância.

Os resultados do teste ANOVA, para todos os aminoácidos se encontram na Tabela 1a e Tabela 2a no anexo, sendo apresentado os valores médios de concentração (\pm desvio padrão) de cada aminoácido nos vinhos estudados, para respetiva levedura utilizada na fermentação, bem como os valores de máximo e mínimo da concentração de cada aminoácido quantificado nos vinhos.

Avaliação do perfil em aminoácidos em vinho branco fermentado com leveduras *Saccharomyces* e leveduras indígenas

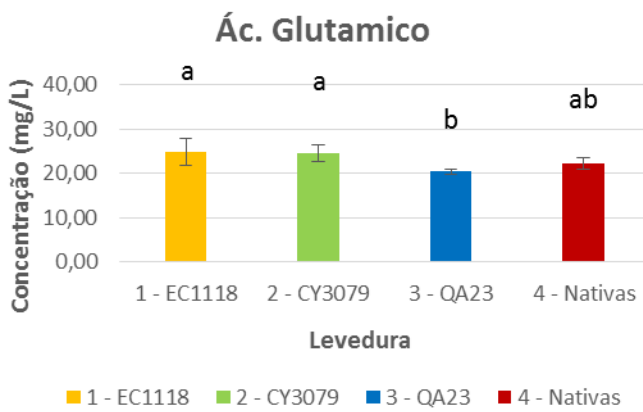


Gráfico 1: Concentração de Ác. Glutâmico para cada levedura.

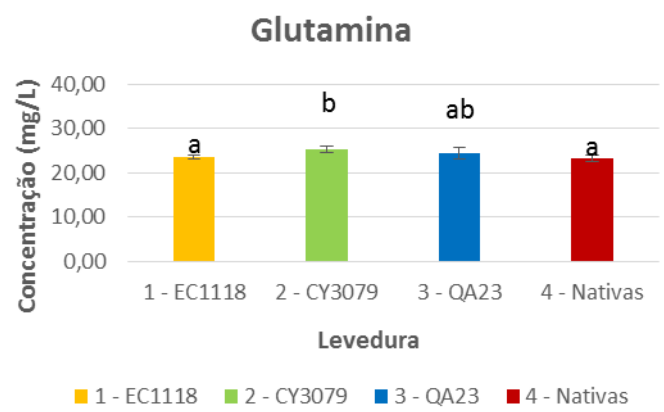


Gráfico 2: Concentração de Glutamina para cada levedura.

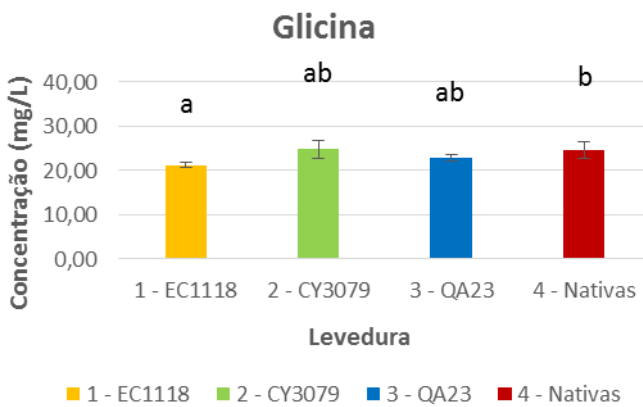


Gráfico 3: Concentração de Glicina para cada levedura.

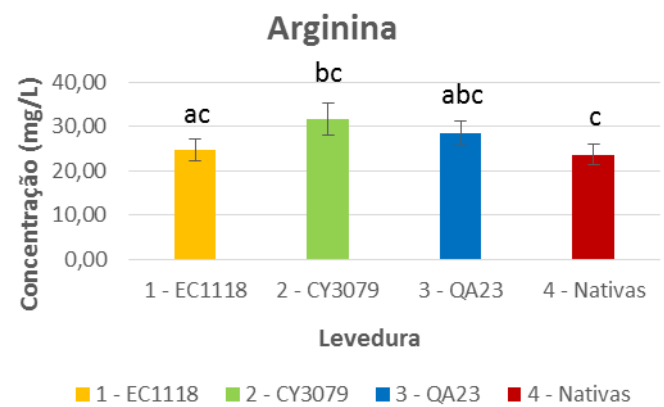


Gráfico 4: Concentração de Arginina para cada levedura.

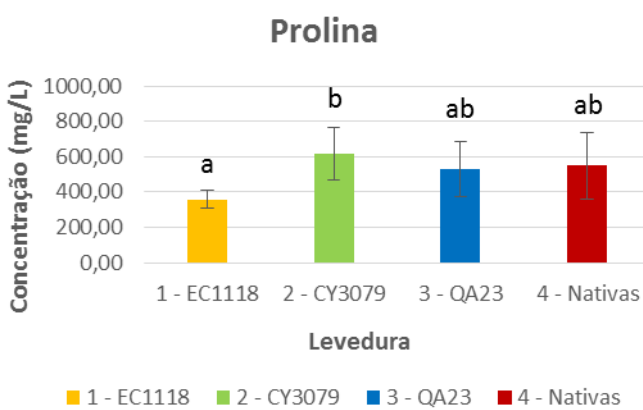


Gráfico 5: Concentração de Prolina para cada levedura.

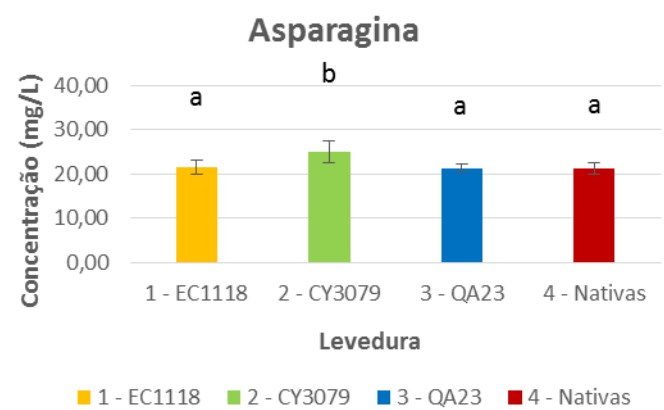


Gráfico 6: Concentração de Asparagina para cada levedura.

Avaliação do perfil em aminoácidos em vinho branco fermentado com leveduras *Saccharomyces* e leveduras indígenas

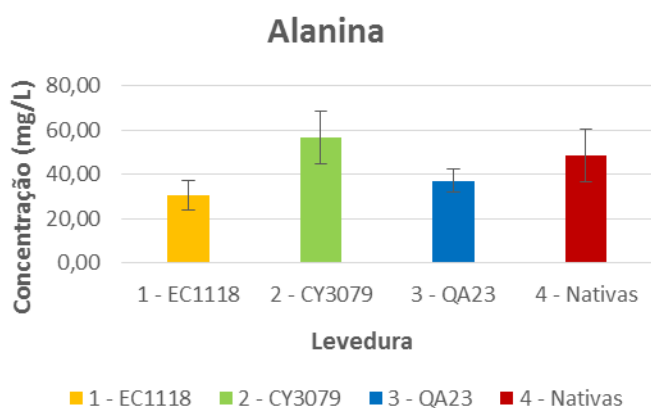


Gráfico 7: Concentração de Alanina para cada levedura.

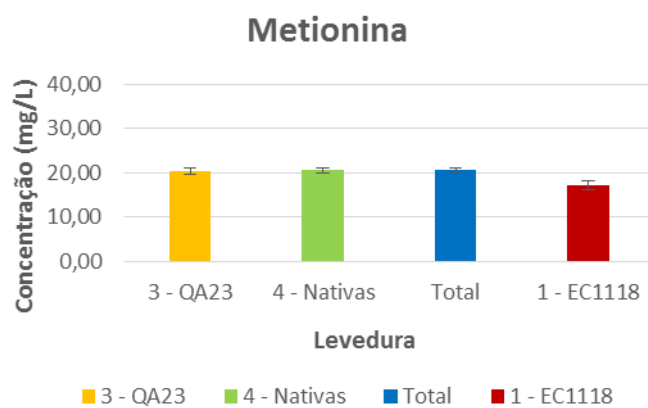


Gráfico 8: Concentração de Metionina para cada levedura.

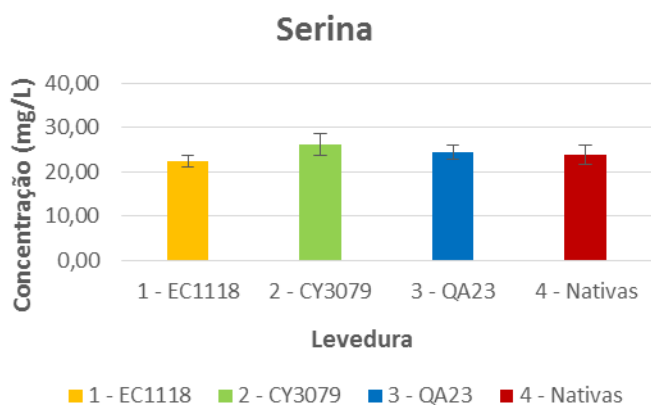


Gráfico 9: Concentração de Serina para cada levedura.

A diferença encontrada no perfil dos aminoácidos, dos diferentes vinhos avaliados, mediante ao tipo de levedura utilizado, pode ser explicado pelo metabolismo dos compostos azotados, que é específico para cada estirpe de levedura.

Neste estudo partimos do princípio de que a concentração de aminoácidos no mosto da uva foi igual para todas as vinificações, uma vez que foi utilizado mosto de uvas do mesmo local.

Durante o processo de fermentação do mosto, os compostos azotados são transportados para as células da levedura, muitos fatores, como pH, concentração de etanol, temperatura, pressão de dióxido de carbono e grau de aeração do meio, podem afetar a assimilação dos aminoácidos (Henschke & Jiranek, 1995).

Além de, cada estirpe levedura possuir algumas permeases de aminoácidos específicas, os aminoácidos possuem uma ordem específica de preferência para serem

assimilados e catabolizados (Fairbairn et al., 2017; Prior et al., 2019; Manginot et al., 1998; Crépin et al., 2012).

Esta ordem de utilização de aminoácidos pode ainda ser influenciada pela concentração das várias fontes de azoto, particularmente o azoto na forma amoniacal, que é uma fonte de azoto com grande preferência neste ambiente e prontamente utilizada (Manginot et al., 1998; Bisson, 1999).

Segundo, Cooper & Sumrada, (1983), as células das leveduras capturam seletivamente compostos azotados do seu mosto por um mecanismo chamado Nitrogen Catabolite Repression (NCR), que tem por função controlar a capacidade da levedura de usar fontes de azoto em baixas concentrações na presença de fontes de azoto com maiores concentrações.

7.3. Resultados da Análise discriminante canônica (CDA)

Neste trabalho consideramos a existência de 4 grupos de vinhos, de acordo com o tipo de levedura utilizado na fermentação alcoólica dos vinhos (1 – EC1118, 2 – CY3079, 3 – QA23, 4 - Nativas).

A Tabela 7, lista os eigenvalues (autovalores), proporções de variância de cada função discriminante canônica e proporções cumulativas de variância total e correlação canônica das três funções discriminantes canônicas obtidas. A Tabela 8, lista os coeficientes padronizados de cada aminoácido para as três funções.

As três funções principais explicam a totalidade da variância, conforme apresentado na Tabela 7.

Eigenvalues				
Function	Eigenvalue	% of Variance	% Cumulative	Canonical Correlation
1	40,407 ^a	42,7	42,7	,988
2	36,104 ^a	38,2	80,9	,986
3	18,020 ^a	19,1	100,0	,973

a. As primeiras 3 funções discriminantes canônicas foram usadas na análise.

Tabela 7: Funções discriminantes usadas na análise e sua distribuição.

Coefficients of standardized canonical discriminant functions

	Função		
	1	2	3
[His]	,213*	,194	,066
[Gly]	-,140*	,090	-,063
[Val]	-,043*	,020	-,002
[asn]	,002	,160*	-,047
[Ala]	-,122	,140*	-,054
[Orn] ^b	,004	,123*	,042
[Lys] ^b	-,056	,110*	-,097
[Met]	-,046	,105*	-,037
[Phe] ^b	-,045	,079*	,016
[Arg]	,036	,139	-,202*
[asp]	,142	-,029	,181*
[glu]	,054	,117	,160*
[Syst]	,013	-,030	-,154*
[Gln]	,038	,124	-,150*
[Ser]	-,040	,083	-,109*
[Prol]	-,075	,055	-,097*
[Tyr]	-,054	,034	-,094*
[GABA]	-,001	,051	-,076*
[Isso]	-,046	,021	-,075*
[Thr]	-,026	,046	-,058*
[Leu] ^b	-,032	,018	-,045*

Correlações entre grupos no conjunto entre variáveis discriminantes e funções discriminantes canônicas padronizadas

Variáveis ordenadas por tamanho absoluto de correlação na função.

*. Maior correlação absoluta entre cada variável e qualquer função discriminante

b. Essa variável não é usada na análise.

Tabela 8: Coeficientes padronizados de cada aminoácido para as três funções.

Wilks' Lambda				
Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Cui-Square	df	Sig.
1 até 3	,000	128,534	51	,000
2 até 3	,001	81,991	32	,000
3	,053	36,819	15	,001

Tabela 9: Valores de Wilki's Lambda

Na Tabela 9 estão listados os valores de Wilki's Lambda para as três funções. Este valor de Wilk's Lambda é uma medida da contribuição de cada função para a separação dos grupos, sendo igual à proporção do total de variância não explicada pelas diferenças entre os grupos. Quanto menor for este valor maior é o poder discriminante obtido.

A representação gráfica mostrada na Figura 10, identifica claramente os 4 tipos de vinhos produzidos com as respectivas leveduras e sua análise permite-nos verificar que é possível agrupar os vinhos em função da sua composição em aminoácidos e de acordo com o tipo de levedura utilizado.

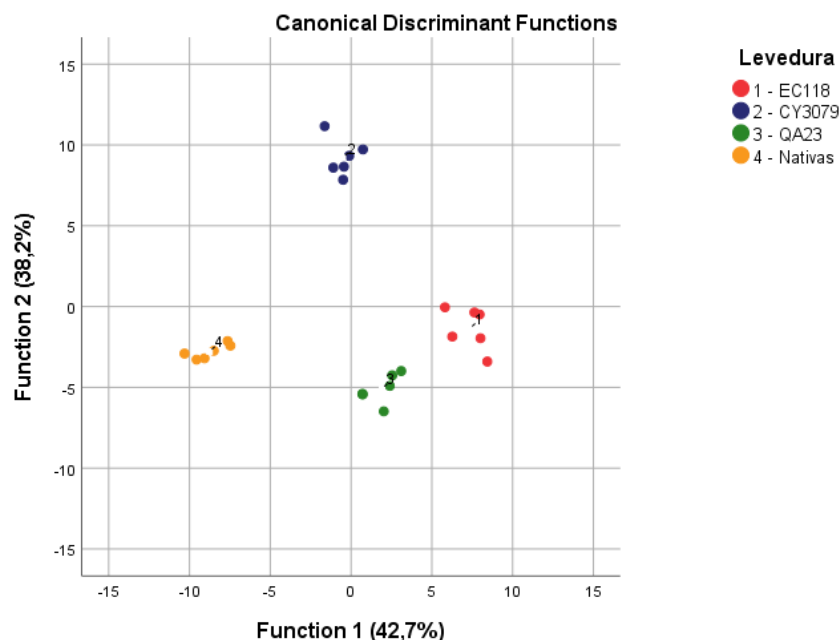


Figura 11: Gráfico das Funções discriminantes canônicas

Como mostrado na Tabela 7 e Figura 11 a função 1 explica 42,7% do total de variância entre as amostras e a função dois contribui com 38,2% do total de variância. Portanto o total de variância explicado por essas duas funções foi de 80,9%.

Relativamente à análise multivariada quando avaliamos os componentes principais em função da sua composição em aminoácidos, conseguimos identificar perfeitamente os quatro tipos de vinho de acordo com a levedura utilizada. O que nos permite dizer que para cada tipo de vinho têm um perfil de aminoácidos próprio, em função da levedura que foi utilizada na fermentação, visto que, sendo o mosto inicial o mesmo, o seu teor em aminoácidos livres era também o mesmo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Mandl et al., (2017). Estes autores verificaram a influência de diferentes leveduras no padrão de aminoácidos do vinho rosé avaliando 27 diferentes leveduras comerciais e concluíram que tiveram diferenças significativas no perfil em aminoácidos dos vinhos.

8. Conclusões

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a influência da utilização de diferentes estirpes de levedura para fermentação de mosto de uva branca, no perfil de aminoácidos dos vinhos, sendo três estirpes comerciais *Saccharomyces* e leveduras nativas.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que os vinhos finais apresentaram um perfil de aminoácidos distinto para cada tratamento de acordo com a levedura utilizada.

Podemos concluir que o perfil de aminoácidos sendo diferente para cada levedura, irá influenciar diretamente nas características organolépticas de cada vinho, sendo necessário um estudo mais aprofundado para identificação e quantificação dos compostos que influenciam o sabor e o aroma.

Além disso o perfil de aminoácidos sendo diferentes para cada levedura, implica que as exigências nutricionais serão diferentes para cada tipo de levedura e nos leva a pensar que, a forma como é feita a nutrição azotada em muitas adegas, aplicando-se a mesma quantidade de azoto para diferentes tipos de leveduras não seria a forma de melhor eficiência.

9. Limitações e Perspectivas futuras

Numa fase inicial deste trabalho, estava prevista a análise da componente volátil dos vinhos por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa, (GM/MS), visto ser bem conhecido que diferentes leveduras dão origem a perfis voláteis diferentes. Porém tal não foi possível. Numa perspectiva de continuação deste trabalho seria interessante analisar a componente volátil dos vinhos e realizar uma análise sensorial com intuito de verificar se as eventuais diferenças encontradas nos perfis voláteis, se conseguem detectar através da análise sensorial e se de facto, a fermentação com diferentes leveduras dá ou não origem a vinhos capazes de serem diferenciados pelos provadores.

10. Referências bibliográficas

- Alberts, B. et al. (2017). *Fundamentos da biologia celular*. Porto Alegre: Artmed
- Alexandre, H. & Charpentier, C.J. *Microbiol Biotech* (1998) 20: 20. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900442>
- Aranda, A., Matallana, E., del Olmo, M., 2011. *Saccharomyces* yeasts I: primary fermentation. In: Carrascosa, A., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 1–31.
- Arrieta, Marina Patricia, and María Soledad Prats-Moya. 2012. "Free Amino Acids and Biogenic Amines in Alicante Monastrell Wines." *Food Chemistry* 135(3): 1511–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.008>.
- Bell S.J., Henschke P. A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **11**, 242-295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- Bisson L.F., Lucy Joseph C.M., and Domizio P. (2017). Yeasts. König H., Uden G., Fröhlich J. (Ed.). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine (Vol. 2, Chap. 3, pp. 65-101)*. Switzerland: Springer
- Boynton PJ, Greig D. 2016. Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species. *Fungal Ecol* **22**:61–72. doi:10.1016/j.funeco.2016.04.008.
- Burin, V.M., Gomes, T.M., Caliar, V., Rosier, J.P., Bordignon Luiz, M.T., 2015. Establishment of influence the nitrogen content in musts and volatile profile of white wines associated to chemometric tools. *Microchem. J.* 122, 20–28.
- Callejón, R. M., A. M. Troncoso, and M. L. Morales. 2010. "Determination of Amino Acids in Grape-Derived Products: A Review." *Talanta* **81**(4–5): 1143–52.
- Campbell, M.K.; Farrel S.O. (2007) *Bioquímica. Versão COMBO. (Vol. 1, ed. 7, pp 65-86)* São Paulo: Cengage Learning
- Comitini, Francesca & Capece, Angela & Ciani, Maurizio & Romano, Patrizia. (2017). New insights on the use of wine yeasts. *Current Opinion in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.005>
- Conde, Carlos et al. 2007. "Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality." *Food* **1**: 1–22. <http://hdl.handle.net/1822/6820>.

Cooper, T.G. (1982a). In "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression" (J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach, eds), pp. 39-100. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Costantini, Edoardo A C, Pierluigi Bucelli, and Simone Priori. (2012). "Quaternary Landscape History Determines the Soil Functional Characters of Terroir." *Quaternary International* **265**: 63–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.quaint.2011.08.021>.

Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2012. Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 8102–8111.

Dong, M.W. (2006). *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Fairbairn, Samantha & McKinnon, Alexander & Musarurwa, Hannibal & C. Ferreira, António & Bauer, Florian. (2017). The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Frontiers in Microbiology*. **8**. 10.3389/fmicb.2017.02554.

Ferreira, Vicente & Lopez, Ricardo & Cacho, Juan. (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. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000901\)80:11<1659::AID-JSFA693>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000901)80:11<1659::AID-JSFA693>3.0.CO;2-6)

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)

Fugelsang K.C., Edwards C.G. (2007). *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures*. New York: Springer.

Gómez-Alonso, S., I. Hermosín-Gutiérrez, and E. García-Romero. 2007. "Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples." : **608–13**.

HARRIS, Daniel C. (2012). *Quantitative chemical analysis*. 8ª ed. USA: W. H. Freeman and Company.

Jiraneck, Vladimir & Langridge, Peter & Henschke, P.A.. (1995). Amino Acid and Ammonium Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts From a Chemically Defined Medium. *American Journal of Enology and Viticulture*. **46**. 75-83.

Kazakevich Y.; Lobrutto, R. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Vol 1, pp 3-24

Lambrechts, M., & Pretorius, I. (2019). Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **21**(1), 97-129.
<https://doi.org/10.21548/21-1-3560>

Mandl, Karin & Silhavy-Richter, Karin & Korntheuer, Karin & Prinz, Martin & Patzl-Fischerleitner, Elsa & Eder, Reinhard. (2017). Influence of different yeasts on the amino acid pattern of rosé wine. *BIO Web of Conferences*. 9. 02014. 10.1051/bio-conf/20170902014.

Manginot C., Roustan J.L., Sablayrolles J.M., 1998. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme Microb. Tech.* **23**, 511-517.

Magalhães, Nuno. *Tratado de Viticultura - A Videira, a Vinha e o Terroir*. Esfera Poética, 2010.

Marullo P. (2010). Yeast selection for wine flavour modulation. Reynolds A.G. (Ed). *Managing wine quality - Oenology and wine quality* (Vol. 2, ed. 1, 293-334) Woodhead Publishing, USA

Mendes-Ferreira, Ana & Barbosa, Catarina & Lage, Patrícia & Mendes-Faia, Arlete. (2011). Impacto do Azoto na Actividade Fermentativa das Leveduras e na Qualidade do Vinho. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. **26**. 17-32.

Meyer, V.R. (2004). *Practical High-Performance Liquid Chromatography, Fourth edition*. Germany: John Wiley & Sons, Ltd.

Molnar Perl (2000), I. Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food. *Journal of Chromatography, A* **891**(1): 1-32
<https://eurekamag.com/research/003/922/003922013.php>

Moreno-Arribas, M.V; Polo, M.C (2009). Amino Acids and Biogenic Amines. In Moreno-Arribas, M.V; Polo, M.C (Eds.). *Wine Chemistry and Biochemistry* (**Vol. 1**, ed. 1, 163-190)

NELSON, D.L.; COX, M.M. (2014) *Lehninger principles of biochemistry*. 6 ed. New York: W.H.Freeman and Company

OIV, (2010). Definition of vitivinicultural terroir. RESOLUTION OIV/VITI 333/2010

Padilla B, Garcia- Fernández D, González B, Izidoro I, Esteve-Zarzoso B, Beltran G and Mas A (2016) Yeast Biodiversity from DOQ Priorat Uninoculated Fermentations. *Front. Microbiol.* 7:930.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00930>

Pinho, Ana. (2016) “Desenvolvimento de uma técnica de HPLC para a quantificação de colistina em plasma humano e a sua monitorização sérica em doentes internados no chuc.” Universidade de Coimbra, Coimbra.

Porto, Helena Sofia Morgado. (2014) “HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos.” Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.

Prior, K.J.; Bauer, F.F.; Divol, B. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine. *Food Microbiol.* 2019, **79**, 75–84.

Ramón D., González R., 2011. Improvement of Wine Yeasts by Genetic Engineering. In: Carrascosa, A., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 169–184.

Rapp, A.; Versini, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Dev. Food Sci.* 1995, **37**, 1659–1694.

Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Alvarez-Buylla, J. R., Martin, M. C., Fernandez, M., et al. (2013). A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatizing agent. *Food Chemistry*, **139**(1), 1029–1035.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.071>

Ribéreau-Gayon, P, D Dubourdieu, Donèche, e Lonvaud (2006a). *Handbook of Enology, Volume 1 - The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons, Ltd.

Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu (2006b). *Handbook of Enology, Volume 2 - The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*. John Wiley & Sons, Ltd.

Rocha, Tiago. (2015) “Desenvolvimento e validação de um método de HPLC-DAD-FLD para a determinação de inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) em suplementos alimentares à base de plantas.” Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto.

Sequeira, Cédric Basílio. (2012) “Análise de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais: aplicação de HPLC-SEC-UV-IR e língua eletrónico.” Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.

Silva, Patrícia Damasceno. (2012) “Determinação de Compostos Fenólicos por HPLC.” Universidade da Beira Interior, Covilhã.

Skoog D.A; F. James Holler F.J; Crouch S.R (2016). *Principles of Instrumental Analysis*. Boston: Cengage Learning

Soufleros, E. H., E. Bouloumpasi, C. Tsarchopoulos, and C. G. Biliaderis. 2003. “Primary Amino Acid Profiles of Greek White Wines and Their Use in Classification according to Variety, Origin and Vintage.” *Food Chemistry* **80**(2): 261–73.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00271-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00271-6)

Specht G. (2010). Yeast fermentation management for improved wine quality. Reynolds A.G. (Ed). *Managing wine quality - Oenology and wine quality* (Vol. 2, ed. 1, 3-29) Woodhead Publishing, USA

Van Leeuwen, Cornelis. (2010). Terroir: The effect of the physical environment on vine growth, grape ripening and wine sensory attributes. *Managing Wine Quality: Viticulture and Wine Quality*. 273-315. 10.1533/9781845699284.3.273.

Van Leeuwen, Cornelis & Seguin, Gerard. (2006). *The concept of terroir in viticulture*. *Journal of Wine Research*. **17**. 1-10. 10.1080/09571260600633135.

Voet, D.; Vpet, J.G.; Pratt, C.W. (2000) *Fundamentos de bioquímica*. Porto Alegre: Art-Med.

Wang, Ya Qin et al. (2014). "Rapid HPLC Analysis of Amino Acids and Biogenic Amines in Wines during Fermentation and Evaluation of Matrix Effect." *Food Chemistry* **163**: 6–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.064>.

Waters. 2017. http://www.waters.com/waters/pt_PT/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=pt_PT (acedido em 2019).

11. Anexo I

Amostra	SO ₂ Livre (mg/dm ³)	SO ₂ Total (mg/dm ³)	Teor Álcool Adquirido (% vol)	Acidez Total (Ác. Tart. g/dm ³)	Acidez Volátil (Ác. Acét. g/dm ³)	pH
1.1 (EC1118)	6	33	13,9	8,94	0,45	3
1.2 (EC1118)	5	27	13,9	6,79	0,45	3,06
1.3 (EC1118)	5	29	13,8	6,73	0,51	3,06
1.4 (EC1118)	4	24	13,8	7,51	0,48	3,06
1.5 (EC1118)	11	13	13,5	5,91	0,57	3,21
1.6 (EC1118)	5	16	13,5	5,96	0,96	3,19
2.1 (CY3079)	5	14	13,5	7,26	0,39	3,07
2.2 (CY3079)	5	14	13,6	8,11	0,45	3,08
2.3 (CY3079)	4	15	13,6	7,51	0,69	3,06
2.4 (CY3079)	5	18	13,6	7,58	0,45	3,05
2.5 (CY3079)	5	22	13,6	6,85	0,48	3,08
2.6 (CY3079)	6	18	13,6	7,30	0,48	3,10
3.1 (QA23)	5	24	13,6	7,01	0,42	3,08
3.2 (QA23)	4	34	13,8	8,69	0,48	2,99
3.3 (QA23)	5	22	13,6	7,13	0,45	3,05
3.4 (QA23)	4	30	13,8	8,75	0,54	3,02
3.5 (QA23)	5	16	13,6	7,01	0,48	3,07
3.6 (QA23)	5	11	13,6	6,75	0,57	3,13
4.1 (Nativas)	5	21	13,6	6,64	0,57	3,12
4.2 (Nativas)	5	21	13,1	6,66	0,69	3,13
4.3 (Nativas)	5	23	13,7	6,56	0,66	3,21
4.4 (Nativas)	5	23	13,5	6,57	0,66	3,16
4.5 (Nativas)	5	19	13,5	6,75	0,66	3,12
4.6 (Nativas)	4	18	13,6	5,50	0,57	3,27

Tabela a 1: Valores dos parâmetros enológicos analisados.

Avaliação do perfil em aminoácidos em vinho branco fermentado com leveduras *Saccharomyces* e leveduras indígenas

AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.	AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.
Ácido Aspártico (Asp)	1	23,51 ± 2,31	20,54	25,46	Ácido Glutâmico (Glu)	1	24,84 ^a ± 2,95	21,59	28,12
	2	20,59 ± 0,07	20,51	20,67		2	24,54 ^a ± 1,96	22,83	28,24
	3	20,65 ± 0,02	20,62	20,68		3	20,39 ^b ± 0,54	19,81	21,38
	4	20,54 ± 0,05	20,46	20,6		4	22,30 ^{ab} ± 1,31	21,01	24,61
AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.	AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.
Asparagina (Asn)	1	21,51 ^a ± 1,7	19,79	23,78	Serina (Ser)	1	22,47 ^a ± 1,3	21,01	24,41
	2	24,82 ^b ± 2,47	21,22	27,48		2	26,20 ^b ± 2,57	23,98	30,36
	3	21,29 ^a ± 0,95	20,18	22,6		3	24,49 ^{ab} ± 1,68	22,22	27,27
	4	21,21 ^a ± 1,23	20,04	23,36		4	23,94 ^{ab} ± 2,26	21,72	27,83
AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.	AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.
Histidina (His)	1	19,80 ± 0,2	19,53	20,05	Glutamina (Gln)	1	23,67 ^a ± 0,41	23,07	24,21
	2	19,70 ± 0,17	19,53	20,01		2	25,30 ^b ± 0,81	24,33	26,36
	3	N/Q	-	-		3	24,38 ^{ab} ± 1,28	22,69	26,21
	4	N/Q	-	-		4	23,23 ^a ± 0,67	22,4	24,12
AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.	AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.
Glicina (Gly)	1	21,27 ^a ± 0,62	20,48	22,18	Treonina (Thr)	1	20,17 ± 0,69	19,65	21,22
	2	24,84 ^{ab} ± 2,09	22,27	27,6		2	21,18 ± 1,19	20,34	23,47
	3	22,81 ^{ab} ± 0,75	21,95	24,04		3	20,70 ± 0,36	20,17	21,13
	4	24,56 ^b ± 1,83	22,28	26,85		4	20,62 ± 1,3	19,79	23,2
AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.	AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.
Arginina (Arg)	1	24,80 ^{ac} ± 2,49	22,22	27,48	Alanina (Ala)	1	30,58 ^{ac} ± 6,56	22,38	40,06
	2	31,69 ^{bc} ± 3,75	26,61	37,08		2	56,71 ^b ± 12,04	41,28	72,22
	3	28,55 ^{abc} ± 2,7	25,54	33,27		3	37,05 ^{ac} ± 5,22	30,76	46,12
	4	23,64 ^a ± 2,27	21,41	26,88		4	48,27 ^{bc} ± 11,9	34,96	65,56

Tabela a 2: Valores médios de concentração mg/L (± desvio padrão) de cada AA nos vinhos, valores de concentração Máx. Mín., e teste ANOVA

Avaliação do perfil em aminoácidos em vinho branco fermentado com leveduras *Saccharomyces* e leveduras indígenas

AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.	AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.
GABA	1	22,39 ± 1,3	19,86	23,65	Prolina (Prol)	1	358,65 ^a ± 49,96	276,26	414,38
	2	25,08 ± 4,23	20,98	33,14		2	615,46 ^b ± 147,6	410,11	817,45
	3	23,91 ± 2,2	20,95	26,76		3	529,72 ^{ab} ± 158,65	334,28	797,39
	4	22,59 ± 2,03	20,23	25,58		4	548,31 ^{ab} ± 188,33	277,28	796,65
AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.	AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.
Tirosina (Tyr)	1	12,52 ± 0,97	11,31	14	Valina (Val)	1	20,65 ± 0,94	19,58	21,92
	2	14,78 ± 2,15	12,44	18,69		2	21,51 ± 2,1	20,07	25,69
	3	14,35 ± 1,34	12,74	16,46		3	20,93 ± 0,85	19,69	22,13
	4	14,16 ± 1,95	12,1	16,74		4	21,68 ± 1,89	20,26	25,41
AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.	AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.
Metionina (Met)	1	20,14 ^a ± 0,74	19,59	21,24	Cisteína (Cys)	1	17,17 ± 0,41	16,66	17,56
	2	21,34 ^b ± 0,53	20,58	22,13		2	17,55 ± 0,86	16,73	19,11
	3	20,30 ^{ab} ± 0,48	19,97	21,23		3	18,34 ± 1,05	17,08	19,38
	4	20,60 ^{ab} ± 0,98	19,93	22,46		4	17,26 ± 0,43	16,7	17,89
AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.	AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.
Isoleucina (Ile)	1	20,44 ± 1,03	19,43	21,93	Leucina (Leu)	1	26,85 ± 3,09	22,9	31,15
	2	21,74 ± 1,36	20,36	24,35		2	30,95 ± 5,73	25,51	42,02
	3	21,59 ± 0,93	20,38	22,92		3	30,15 ± 4,12	24,33	35,7
	4	21,51 ± 1,59	20,16	24,38		4	29,05 ± 5,31	24,33	38,91
AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.	AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.
Fenilalanina (Phe)	1	24,81 ± 1,22	22,82	26,27	Ornitina (Orn)	1	19,87 ± 0,57	19,39	20,72
	2	26,57 ± 2,52	24,04	31,35		2	20,18 ± 0,55	19,65	21,21
	3	25,31 ± 1,31	23,39	27,15		3	19,56 ± 0,15	19,4	19,8
	4	26,14 ± 1,84	24,45	29,52		4	19,65 ± 0,28	19,44	20,19
AA	Levedura	Média ± DP	Mín.	Máx.					
Lisina (Lys)	1	24,97 ± 2,21	21,56	28,05					
	2	30,48 ± 4,00	25,43	37,26					
	3	28,51 ± 2,93	24,83	32,99					
	4	27,93 ± 4,22	24,01	34,42					

Tabela a 3: Valores médios de concentração mg/L (± desvio padrão) de cada AA nos vinhos, valores de concentração Máx. Mín., e teste ANOVA

12. Anexo II

LEVEDURAS

CY3079

BRANCOS COMPLEXOS PARA SEGMENTOS PREMIUM E FERMENTAÇÃO EM BARRICA

O Chardonnay é uma das castas brancas mais nobre e conhecidas mundialmente, sendo parte importante dos vinhedos de regiões vitivinícolas como Chablis, Borgonha, Languedoc, Trentino, Califórnia, Chile, Argentina, Austrália etc...

A diversidade de "terroirs", os diferentes métodos de vinificação e o número de clones, fazem com que os vinhos de Chardonnay ofereçam uma grande variedade aromática.

O estágio sobre borras em barrica aumenta a complexidade aromática dos vinhos. Para o Chardonnay esta técnica de estágio é originária da Borgonha.

A levedura **CY3079** foi selecionada pelo BIVB (Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne) com o objetivo de realçar o potencial qualitativo e a expressão aromática da casta Chardonnay em solos da Borgonha.

Como resultando da utilização ao longo de anos, a **CY3079** tornou-se a levedura de referência para o Chardonnay fermentado e/ou estagiado em madeira. Os aromas usualmente libertados por esta levedura durante a autólise (notas de manteiga, pão tostado e levedura) reforçam os aromas provenientes da madeira: madeira de carvalho, baunilha e tostado.

Para além disso graças à elevada libertação precoce de polissacarídeos parietais (desde o final da fermentação alcoólica) a **CY3079** confere aos vinhos maior volume de boca, permitindo integrar e equilibrar os taninos da madeira.

Desde que a sua utilização se alargou aos grandes vinhos brancos no mundo, esta levedura contribui para uma maior complexidade aromática dos vinhos.

APLICAÇÃO E RESULTADOS

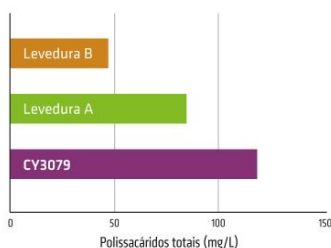
CARACTERÍSTICAS DA LEVEDURA:

Saccharomyces cerevisiae, var. *cerevisiae*

- ▶ Neutra em relação ao fator killer
- ▶ Boa tolerância ao álcool < 15,5%
- ▶ Fase de latência média
- ▶ Velocidade de fermentação média
- ▶ Final de fermentação lento devido a um fenómeno precoce de autólise que favorece a redondez
- ▶ Temperatura de fermentação óptima: 15 a 25°C
- ▶ Necessidade elevada de azoto assimilável. Recomenda-se a utilização de um protector de levedura e de uma boa nutrição.
- ▶ Baixa produção de acidez volátil.
- ▶ Sensível a deficiências de O₂
- ▶ Produção média de SO₂
- ▶ Baixa formação de espuma
- ▶ Facilita FML
- ▶ Boa sedimentação das borras

Produção de polissacáridos e tipo de Chardonnay

Libertação de polissacáridos totais durante a fermentação alcoólica por diferentes leveduras



Alguns polissacáridos libertados durante a fermentação participam na sensação gustativa de volume de boca.



Figura a 1: Ficha técnica da levedura CY3079.

LEVEDURAS

CY3079

QUALIDADE E SEGURANÇA ALIMENTAR

- ▶ OGM – Ausência de Organismos Geneticamente Modificados, não foi produzido a partir dos mesmos e não inclui substâncias com origem nos referidos organismos.
- ▶ Ionização - Não tratado por radiação.
- ▶ Alergênicos - Ausência de substâncias ou produtos que causam alergias ou intolerâncias, referidos no anexo II do Regulamento CE 1169/2011.
- ▶ Nanomateriais - Não foi produzido utilizando nano tecnologia e portanto não contém nanomateriais, de acordo com o Regulamento CE 1169/2011.
- ▶ Codex Enológico Internacional (CEI) e Legislação europeia: Está conforme o CEI versão em vigor e Regulamento CE 606/2009 - Regras de execução do Regulamento CE 479/2008 no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis.

DOSAGEM E MODO DE UTILIZAÇÃO

Recomendada em vinhos brancos: 20 a 30 g/hL

- ▶ É necessário adaptar a dose de inoculação em função do estado sanitário das uvas e da adega.
- ▶ A duração total da reidratação não deverá ser superior a 45 min.
- ▶ É essencial reidratar a levedura num recipiente limpo.
- ▶ A reidratação em mosto não é aconselhável.
- ▶ Em condições difíceis reidratar com um protetor de levedura da gama **GO-FERM**.

REIDRATAÇÃO:

1. Reidratar em 10 vezes o seu peso em água a 35 – 40°C. Ao utilizar um protetor de levedura da gama **GO-FERM** dissolver primeiro o protetor (30g/hL) em 20 vezes o seu peso em água a 40°C. Agitar suavemente para eliminar qualquer grumo. Quando o protetor da levedura estiver bem dissolvido adicionar a levedura.
2. Deixar repousar 20 minutos e agitar lentamente.
3. Incorporar a levedura diretamente no mosto. Para evitar o choque térmico a diferença de temperatura entre a levedura reidratada e o mosto não deverá ser superior a 10°C. Para isso adicionar progressivamente um volume equivalente de mosto à levedura reidratada (exemplo: para 10LT de levedura reidratada adicionar 10LT de mosto). Esta etapa poderá ser repetida.

ESPECIFICAÇÕES

Aparência e Odor: Pó de cor bege a castanho claro com cheiro característico a levedura.
Ingredientes: Levedura seca activa *Saccharomyces cerevisiae*, E491
Leveduras viáveis > 10¹⁰ufc/g; Matéria Seca > 92%; Coliformes < 10⁴ufc/g; *E. coli* - Ausente/g; *S. aureus* - Ausente/g; *Salmonella* - Ausente/25g; Bactérias Lácticas < 10³ufc/g; Bactérias Acéticas < 10⁴ufc/g; Bolores < 10³ufc/g; Leveduras de outras espécies < 10⁴ufc/g; Chumbo < 2mg/kg; Mercúrio < 1mg/kg; Arsénio < 3mg/kg; Cádmio < 1mg/kg

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

500g

Embalagem fechada e selada de origem:
Local seco com temperatura < 25°C.
Após abertura utilizar rapidamente.

Garantimos a qualidade deste produto na sua embalagem de origem e utilizado de acordo com a data de validade e condições de armazenamento. A informação presente neste documento é verdadeira e baseada no nosso conhecimento atual, no entanto não deverá ser considerada como uma garantia expressa ou uma condição para venda deste produto.



Travessa das Lages, 267
Apt. 547 | 4405-194 VN Gaia
Portugal
T. 227 150 840 | F. 227 150 849 | M. 917 850 372
proenol@proenol.com | www.proenol.com

FT0062-08_Junio2017

Figura a 1: Ficha técnica da levedura CY3079.

LEVEDURAS

EC1118

SEGURANÇA FERMENTATIVA, RESPEITO VARIETAL E ESPUMANTIZAÇÃO

Isolada na região de Champagne a sua utilização foi validada pelo "Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne" (CIVC) para a segunda fermentação em garrafa.

A segurança fermentativa é uma das principais preocupações dos enólogos. No entanto, por vezes é difícil consegui-la com certas leveduras devido à variedade dos processos de vinificação e à multiplicidade dos "terroirs". A **EC1118** está numa posição privilegiada para assegurar a implantação porque inibe leveduras sensíveis e possui uma capacidade fermentativa notável numa larga gama de condições.

A neutralidade aromática da **EC1118** associada às suas qualidades fermentativas fazem com que seja igualmente utilizada na fermentação de vinhos base, na espumantização, na reativação de fermentações paradas e na vinificação de variedades ricas em precursores aromáticos varietais.

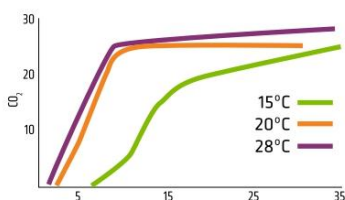
Esta levedura está disponível na forma de produção tradicional e também na forma biológica.

APLICAÇÃO E RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DA LEVEDURA:

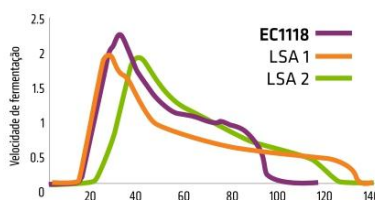
Saccharomyces cerevisiae, var. *bayanus*

- ▶ Fator killer
- ▶ Tolerância elevada ao álcool: até 18 % (v/v)
- ▶ Fase de latência curta
- ▶ Cinética fermentativa rápida mesmo numa ampla gama de valores de pH
- ▶ Ampla gama de temperaturas de fermentação incluindo a baixas temperaturas (ótima entre 10 a 30°C)
- ▶ Baixa necessidade de azoto assimilável
- ▶ Baixa necessidade de O₂ (especialmente a baixas temperaturas)
- ▶ Produção baixa de acidez volátil
- ▶ Produção média de SO₂
- ▶ Produção baixa de H₂S
- ▶ Escassa produção de espuma



Cinética fermentativa da EC1118 a diferentes temperaturas.

Cinéticas fermentativas a 24°C



Comparação de cinéticas fermentativas entre 3 leveduras.



LALLEMAND OENOLOGY

Figura a 2: Ficha técnica da levedura EC1118.

LEVEDURAS

EC1118

QUALIDADE E SEGURANÇA ALIMENTAR

- ▶ OGM – Ausência de Organismos Geneticamente Modificados, não foi produzido a partir dos mesmos e não inclui substâncias com origem nos referidos organismos.
- ▶ Ionização - Não tratado por radiação.
- ▶ Alergênicos - Ausência de substâncias ou produtos que causam alergias ou intolerâncias, referidos no anexo II do Regulamento CE 1169/2011
- ▶ Nanomateriais - Não foi produzido utilizando nano tecnologia e portanto não contém nanomateriais, de acordo com o Regulamento CE 1169/2011.
- ▶ Codex Enológico Internacional (CEI) e Legislação europeia: Está conforme o CEI versão em vigor e Regulamento CE 606/2009 - Regras de execução do Regulamento CE 479/2008 no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis.

DOSAGEM E MODO DE UTILIZAÇÃO

Vinificação de vinhos brancos, tintos e rosés: 20 a 30 g/hL.

Espumantização: 50g/hL.

Para reiniciar fermentações lentas ou paradas: 40g/hL.

É aconselhável adaptar a dose de utilização em função do estado sanitário das uvas e da higiene da adega.

- ▶ A duração total da reidratação não deverá ser superior a 45 min.
- ▶ É essencial reidratar a levedura num recipiente limpo.
- ▶ A reidratação em mosto não é aconselhável.
- ▶ Em condições difíceis reidratar com um protetor de levedura da gama **GO-FERM**.

REIDRATAÇÃO:

1. Reidratar em 10 vezes o seu peso em água a 35 – 40°C.

Ao utilizar um protetor de levedura da gama **GO-FERM** dissolver primeiro o protetor (30g/hL) em 20 vezes o seu peso em água a 40°C. Agitar suavemente para eliminar qualquer grumo. Quando o protetor da levedura estiver bem dissolvido adicionar a levedura.

2. Deixar repousar 20 minutos e agitar lentamente.
3. Incorporar a levedura diretamente no mosto. Para evitar o choque térmico a diferença de temperatura entre a levedura reidratada e o mosto não deverá ser superior a 10°C. Para isso adicionar progressivamente um volume equivalente de mosto à levedura reidratada (exemplo: para 10Lt de levedura reidratada adicionar 10Lt de mosto). Esta etapa poderá ser repetida.

ESPECIFICAÇÕES

Aparência e Odor: Pó de cor bege a castanho claro com cheiro característico a levedura.

Ingredientes: Levedura seca activa *Saccharomyces cerevisiae*, E491

Leveduras viáveis > 10¹⁰ufc/g; Matéria Seca > 92%; Coliformes < 10⁴ufc/g; *E. coli* - Ausente/g; *S. aureus* - Ausente/g; *Salmonella* - Ausente/25g; Bactérias Lácticas < 10⁴ufc/g; Bactérias Acéticas < 10⁴ufc/g; Fungos < 10³ufc/g; Leveduras de outras espécies < 10⁴ufc/g; Chumbo < 2mg/kg; Mercúrio < 1mg/kg; Arsénio < 3mg/kg; Cádmio < 1mg/kg

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

500g

Embalagem fechada e selada de origem:

Local seco com temperatura < 25°C.

Após abertura utilizar rapidamente.

Garantimos a qualidade deste produto na sua embalagem de origem e utilizado de acordo com a data de validade e condições de armazenamento. A informação presente neste documento é verdadeira e baseada no nosso conhecimento atual, no entanto não deverá ser considerada como uma garantia expressa ou uma condição para venda deste produto.



Travessa das Lages, 267
Apt. 547 | 4411-701 VN Gaia
T. 227 150 840
proenol@proenol.com | www.proenol.com

FT0069-08_Março 2019

Figura a 2: Ficha técnica da levedura EC1118.

LEVEDURAS

QA23

INTENSIDADE AROMÁTICA E SEGURANÇA FERMENTATIVA

A levedura **QA23** Lalvin foi seleccionado na região Vinhos Verdes em Portugal pela CVRVV em parceria com a UTAD e a Proenol.

A vinificação de mostos brancos clarificados a baixa temperatura é um processo utilizado em muitas adegas com castas nobres como o Muscat, Sauvignon, Chardonnay e Verdejo e também em castas neutras como Airen ou Macabeo. Este tipo de vinificação realizada geralmente na ausência de oxigénio pode ser problemática para a maioria das leveduras, especialmente se esta carência está associada a um baixo teor de azoto assimilável.

A **QA23** foi seleccionada porque entre outras qualidades oferece segurança fermentativa aliada a baixa exigência em azoto assimilável e oxigénio. Esta levedura associa as suas características essenciais à apetência para revelar aromas cítricos (limão verde, toranja) em castas brancas aromáticas.

APLICAÇÃO E RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DA LEVEDURA:

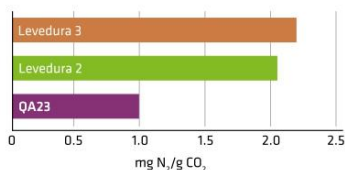
Saccharomyces cerevisiae bayanus

- ▶ Possui fator killer
- ▶ Tolerância ao álcool até 16%.v/v
- ▶ Fase de latência média
- ▶ Cinética de fermentação rápida
- ▶ Levedura frutófila que completa facilmente a fermentação
- ▶ Ampla gama de temperatura de fermentação: 15 a 32°C
- ▶ Exigência muito baixa em azoto facilmente assimilável a qualquer temperatura (18 a 28°C)
- ▶ Baixa necessidade de O₂

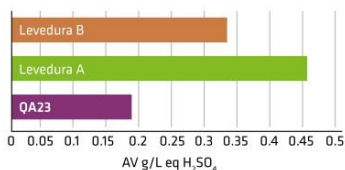
- ▶ Baixa produção de acidez volátil (< 0.2g/L eq H₂SO₄)
- ▶ Baixa produção de SO₂
- ▶ Produção baixa de H₂S devido a baixa necessidade de azoto assimilável
- ▶ Baixa produção de espuma

SEGURANÇA FERMENTATIVA E AROMAS:

Necessidades em azoto assimilável em meio sintético com carência de N: (Julien, 1999)



Produção de acidez volátil na vinificação de um mosto muito clarificado (20 ntu de turbidez)



Degustação realizada por profissionais em Enologia durante as vindimas de 1992 a 1994.

Castas	Região vitivinícola	Aromas
Chardonnay	Oregon, Chile	Toranja, ananás
Moscatel	Vale de Loire, França	Aromas de frutas brancas (vinhos jovens), frutos secos (vinhos após estágio).
Ugni-blanc	Gers, França	Frutas frescas, notas florais (papoila e rosa)
Moscatel de grainha pequena	Roussillon, França	Citrinos, banana, pêssego branco



Figura a 3: Ficha técnica da levedura QA23.

LEVEDURAS

CY3079

QUALIDADE E SEGURANÇA ALIMENTAR

- ▶ OGM - Ausência de Organismos Geneticamente Modificados, não foi produzido a partir dos mesmos e não inclui substâncias com origem nos referidos organismos.
- ▶ Ionização - Não tratado por radiação.
- ▶ Alergênicos - Ausência de substâncias ou produtos que causam alergias ou intolerâncias, referidos no anexo II do Regulamento CE 1169/2011.
- ▶ Nanomateriais - Não foi produzido utilizando nano tecnologia e portanto não contém nanomateriais, de acordo com o Regulamento CE 1169/2011.
- ▶ Codex Enológico Internacional (CEI) e Legislação europeia: Está conforme o CEI versão em vigor e Regulamento CE 606/2009 - Regras de execução do Regulamento CE 479/2008 no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis.

DOSAGEM E MODO DE UTILIZAÇÃO

Recomendada em vinhos brancos: 20 a 30 g/hL

- ▶ É necessário adaptar a dose de inoculação em função do estado sanitário das uvas e da adegas.
- ▶ A duração total da reidratação não deverá ser superior a 45 min.
- ▶ É essencial reidratar a levedura num recipiente limpo.
- ▶ A reidratação em mosto não é aconselhável.
- ▶ Em condições difíceis reidratar com um protetor de levedura da gama **GO-FERM**.

REIDRATAÇÃO:

1. Reidratar em 10 vezes o seu peso em água a 35 - 40°C.
Ao utilizar um protetor de levedura da gama **GO-FERM** dissolver primeiro o protetor (30g/hL) em 20 vezes o seu peso em água a 40°C. Agitar suavemente para eliminar qualquer grumo. Quando o protetor da levedura estiver bem dissolvido adicionar a levedura.
2. Deixar repousar 20 minutos e agitar lentamente.
3. Incorporar a levedura diretamente no mosto. Para evitar o choque térmico a diferença de temperatura entre a levedura reidratada e o mosto não deverá ser superior a 10°C. Para isso adicionar progressivamente um volume equivalente de mosto à levedura reidratada (exemplo: para 10LT de levedura reidratada adicionar 10LT de mosto). Esta etapa poderá ser repetida.

ESPECIFICAÇÕES

Aparência e Odor: Pó de cor bege a castanho claro com cheiro característico a levedura.
Ingredientes: Levedura seca activa *Saccharomyces cerevisiae*, E491
Leveduras viáveis > 10¹⁰ufc/g; Matéria Seca > 92%; Coliformes < 10⁴ufc/g; *E. coli* - Ausente/g; *S. aureus* - Ausente/g; *Salmonella* - Ausente/25g; Bactérias Láticas < 10⁴ufc/g; Bactérias Acéticas < 10⁴ufc/g; Bolores < 10³ufc/g; Leveduras de outras espécies < 10⁴ufc/g; Chumbo < 2mg/kg; Mercúrio < 1mg/kg; Arsénio < 3mg/kg; Cádmio < 1mg/kg

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

500g

Embalagem fechada e selada de origem:
Local seco com temperatura < 25°C.
Após abertura utilizar rapidamente.

Garantimos a qualidade deste produto na sua embalagem de origem e utilizado de acordo com a data de validade e condições de armazenamento. A informação presente neste documento é verdadeira e baseada no nosso conhecimento atual, no entanto não deverá ser considerada como uma garantia expressa ou uma condição para venda deste produto.



Travessa das Lages, 267
Apt. 547 | 44.05-194 VN Gaia
Portugal
T. 227 150 840 | F. 227 150 849 | M. 917 850 372
proenol@proenol.com | www.proenol.com

FT0062-08_Julho2017

Figura a 3: Ficha técnica da levedura QA23.