

LUCIANO MANFROI

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO E DA COMPOSIÇÃO
DE VINHO MERLOT ELABORADO COM DIFERENTES ESPÉCIES
DE *SACCHAROMYCES*, *OENOCOCCUS* E *LACTOBACILLUS***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M276a
2002

Manfroi, Luciano, 1969-

Avaliação do processo fermentativo e da composição de
vinho Merlot elaborado com diferentes espécies de
Saccharomyces, *Oenococcus* e *Lactobacillus* / Luciano
Manfroi. – Viçosa : UFV, 2002.

119p. : il.

Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa

1. Vinho - Qualidade. 2. Vinho - Fermentação por
leveduras. 3. Vinho - Fermentação por bactérias. 4.
Saccharomyces. 5. *Oenococcus*. 6. *Lactobacillus*. 7.
Aminas. 8. Análise cromatográfica. 9. Vinho - Análise
sensorial. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 663.2013

CDD 20.ed. 663.2013

LUCIANO MANFROI

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO E DA COMPOSIÇÃO
DE VINHO MERLOT ELABORADO COM DIFERENTES ESPÉCIES
DE *SACCHAROMYCES*, *OENOCOCCUS* E *LACTOBACILLUS***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 14 de novembro de 2002.

Dr. Luiz Antenor Rizzon
(Conselheiro)

Prof. José Carlos Gomes
(Conselheiro)

Prof. Afonso Mota Ramos
(Membro)

Prof^a. Maria Beatriz A. Glória
(Membro)

Prof. Paulo Henrique Alves da Silva
(Orientador)

*"Ainda que eu fale as línguas dos homens
e dos anjos, senão tiver amor,
serei como o bronze que soa, ou como
o címbalo que retine.
Ainda que eu tenha o dom de profetizar
e conheça todos os mistérios e toda a ciência;
ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto
de transportar montanhas,
se não tiver amor, nada serei."*

*A DEUS,
pela vida e
pelo dom de
querer vencer !*

*À minha família,
A Cristiane,
minha eterna gratidão.*

Jesus disse:

" - Eu sou a videira verdadeira, e o meu Pai é o lavrador. Todos os ramos que não dão uvas ele corta, embora eles estejam em mim. Mas os ramos que dão uvas ele poda a fim de que fiquem limpos e dêem mais uvas ainda."

João 15, 1-4

A ceia do Senhor

Então Jesus pegou o cálice de vinho, deu graças a Deus e disse:

- Peguem isto e repartam entre vocês. Pois eu afirmo a vocês que nunca mais beberei deste vinho até que chegue o reino de Deus.

Depois pegou o pão e deu graças a Deus. Em seguida partiu o pão e o deu aos apóstolos, dizendo:

- Isto é o meu corpo que é entregue em favor de vocês. Façam isto em memória de mim.

Depois do jantar, do mesmo modo deu a eles o cálice de vinho dizendo:

- Este cálice é a nova aliança feita por Deus com o seu povo, aliança que é garantida pelo meu sangue, derramado em favor de vocês.

Lucas 22, 17-20

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Paulo Henrique Alves da Silva pela orientação, amizade, compreensão e experiência profissional.

Ao pesquisador Dr. Luiz Antenor Rizzon pela orientação e apoio na condução do trabalho experimental e também pela amizade e companheirismo.

Aos professores Dr. José Carlos Gomes e Dr. Afonso Mota Ramos, pela amizade no transcorrer do curso e ao professor Dr. Nélio José de Andrade pela confiança e compreensão.

A professora Maria Beatriz A. Glória pelas sugestões e acompanhamento na realização de análises no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

À Embrapa Uva e Vinho, na pessoa do Dr. José Fernando da Silva Protas.

Aos funcionários da Embrapa Uva e Vinho pela colaboração na execução deste trabalho, especialmente de Vânia, Raul, Magda, Nilda, Irineu e Vanderlei.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À direção do Centro Federal de Educação Tecnológica de Petrolina pelo apoio nesta etapa final de conclusão.

À minha noiva Cristiane, pela sua presença em minha vida, compreensão, paciência, carinho e o mais importante, por ter acreditado nos meus ideais.

À minha família, pelo apoio, carinho e confiança em todos os momentos difíceis e gloriosos do qual passamos juntos ou afastados pela distância, que apesar das dificuldades, sempre estiveram presentes.

Aos meus amigos Luís Gustavo, Geraldo e Noemir pelas incansáveis discussões para nosso crescimento crítico e sobretudo pelo companheirismo.

Aos meus grandes amigos César, Robson e Satoru pelo companheirismo, pela batalha diária e além de tudo uma eterna amizade.

Aos meus queridos amigos, em especial, Juliano, Gaspar, Marcelo, Sandi, Patrícia, Renatinho, Tarso, Sílvia, Iratan, Rosângela, Silmara, Ivar, Alcides, Roberto, Gilmar, Beno, Rodinei, Maira, Valmir, Elias Filho, Lais, Lorena Carvalho, Lorena Ybarra, Zé Luciano, André e tantos outros que fazem parte desta amizade e que não estão listados por simples esquecimento.

BIOGRAFIA

LUCIANO MANFROI, filho de Caetano Manfroi e Maria Chesini Manfroi, nasceu em Garibaldi, Estado do Rio Grande do Sul, em 18 de abril de 1969.

Em setembro de 1994, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Mestrado em Fitotecnia, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, obtendo o título de *Magister Scientiae* em setembro de 1997.

Em outubro de 1998, iniciou o Curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Em fevereiro de 2002, iniciou sua carreira no magistério como professor do Curso de Agroindústria e Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Centro Federal de Educação Tecnológica de Petrolina, PE.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Histórico da produção de uva e vinho.....	3
2.2. Leveduras etanologênicas.....	5
2.2.1. Metabolismos das leveduras etanologênicas.....	5
2.2.1.1. Metabolismo do carbono de <i>Saccharomyces</i>	5
2.2.1.2. Metabolismo do nitrogênio de <i>Saccharomyces</i>	7
2.3. Influência do meio de crescimento na fermentação alcoólica.....	9
2.3.1. Efeitos do oxigênio sobre a fermentação alcoólica.....	9
2.3.2. Efeitos da concentração de açúcares sobre a fermentação alcoólica.....	10
2.3.3. Efeitos do pH sobre a fermentação alcoólica.....	10
2.3.4. Efeitos da temperatura sobre a fermentação alcoólica.....	11
2.3.5. Efeitos do etanol sobre o crescimento de leveduras.....	12
2.4. Bactérias Lácticas em produção de vinhos.....	13
2.4.1. Metabolismos das bactérias malolácticas.....	15
2.4.1.1. Metabolismo de carbono das bactérias malolácticas	15
2.4.1.2. Metabolismo do nitrogênio das bactérias malolácticas.....	15
2.5. Processo de fermentação maloláctica em vinhos	16
2.6. Influência do meio fermentativo na fermentação maloláctica.....	18
2.6.1. Efeitos do pH sobre a fermentação maloláctica.....	19

2.6.2. Efeitos da temperatura sobre a fermentação maloláctica....	20
2.6.3. Efeitos da aeração sobre a fermentação maloláctica.....	20
2.6.4. Efeitos de nutrientes sobre a fermentação maloláctica.....	21
2.6.5. Efeitos do etanol sobre a fermentação maloláctica	22
2.6.6. Efeitos do dióxido de Enxofre sobre a fermentação maloláctica.....	22
2.6.7. Efeitos de ácidos orgânicos sobre a fermentação maloláctica.....	24
2.7. Influência dos compostos fenólicos na qualidade do vinho.....	25
2.8. Influência dos compostos voláteis na qualidade do vinho.....	28
2.9. Aminas bioativas em vinhos.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Elaboração do Vinho.....	34
3.2. Métodos Analíticos.....	36
3.2.1. Densidade.....	36
3.2.2. pH	36
3.2.3. Grau alcoólico.....	36
3.2.4. Acidez total.....	37
3.2.5. Acidez volátil.....	37
3.2.6. Acidez fixa.....	38
3.2.7. Açúcares redutores.....	38
3.2.8. Dióxido de enxofre livre.....	38
3.2.9. Dióxido de enxofre total.....	38
3.2.10. Polifenóis totais.....	39
3.2.11. Extrato seco.....	39
3.2.12. Extrato seco reduzido.....	39
3.2.13. Relação álcool em peso/extrato seco reduzido.....	39
3.2.14. Cinzas.....	40
3.2.15. Alcalinidade das cinzas.....	40
3.2.16. Antocianinas.....	40
3.2.17. Taninos totais.....	41
3.2.18. Índices 420, 520 e 620.....	41

3.2.19. Nitrogênio total.....	42
3.2.20. Ácidos láctico, málico e tartárico.....	42
3.2.21. Compostos voláteis.....	44
3.2.22. Aminas bioativas.....	46
3.3. Análise sensorial.....	48
3.4. Análise estatística.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Evolução da fermentação alcoólica e maloláctica.....	50
4.1.1. Densidade.....	50
4.1.2. pH.....	53
4.1.3. Acidez total.....	55
4.1.4. Acidez volátil.....	57
4.1.5. Nitrogênio total.....	59
4.1.6. Ácido málico.....	61
4.1.7. Ácido láctico.....	63
4.1.8. Ácido tartárico.....	65
4.2. Composição físico-química do vinho Merlot.....	67
4.2.1. Densidade.....	67
4.2.2. Graduação alcoólica.....	68
4.2.3. Acidez total.....	68
4.2.4. Acidez volátil.....	69
4.2.5. Acidez fixa.....	69
4.2.6. pH.....	69
4.2.7. Açúcares redutores.....	71
4.2.8. Extrato seco.....	71
4.2.9. Componentes da cor.....	72
4.2.10. Cinzas e alcalinidade das cinzas.....	75
4.2.11. Antocianinas.....	75
4.2.12. Polifenóis totais.....	77
4.2.13. Taninos.....	77
4.2.14. Dióxido de enxofre livre e total.....	78
4.2.15. Compostos voláteis.....	79

4.2.16. Aminas bioativas.....	84
4.3. Análise sensorial do vinho.....	91
5. CONCLUSÕES	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
7. APÊNDICE	110

LISTA DE FIGURAS

1.	Comportamento da densidade durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001.....	51
2.	Comportamento do pH durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001.....	54
3.	Comportamento da acidez total durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001.....	56
4.	Comportamento da acidez volátil durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001.....	58
5.	Comportamento do nitrogênio total durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001.....	60
6.	Comportamento do ácido málico durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001.....	62
7.	Comportamento do ácido láctico durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001.....	64
8.	Comportamento do ácido tartárico durante as fermentações alcoólica e maloláctica (FA - FML) da uva Merlot na safra 2001.....	66

9.	Teores totais de aminos bioativas em vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	87
10.	Contribuição percentual de cada amina em relação a concentração total de aminos em vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	88
11.	Influência do tipo de levedura na fermentação alcoólica e na concentração média de aminos bioativas em vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	89
12.	Influência do tipo de bactéria na fermentação maloláctica e na concentração média de aminos bioativas em vinho Merlot elaborado na safra 2001	90

LISTA DE TABELAS

1.	Principais bactérias lácticas encontradas em mostos e vinhos.....	14
2.	Tratamentos empregados na elaboração do vinho Merlot.....	35
3.	Condições operacionais utilizadas na determinação de ácidos orgânicos, em mostos e vinhos, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
4.	Condições operacionais utilizadas na determinação de compostos voláteis no vinho por cromatografia gasosa (CG).....	45
5.	Equação da reta e coeficiente de correlação da regressão linear da curva padrão e limite de quantificação de cada amina bioativa.....	48
6.	Análises de densidade, álcool, acidez total, acidez volátil e acidez fixa do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	67
7.	Análises de pH, açúcares redutores, extrato seco, extrato seco reduzido e relação álcool/extrato seco reduzido do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	70
8.	Análises dos Índices 420, 520 e 620, coloração (I420/I520) e intensidade de cor (I420+I520+I620) do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	73

9. Análise das cinzas, alcalinidade das cinzas, antocianinas, polifenóis totais e taninos do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	76
10. Análise de dióxido de enxofre livre e dióxido de enxofre total do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	79
11. Concentração de compostos voláteis no vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	81
12. Concentração de aminas bioativas do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	85
13. Análise sensorial: exame visual do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	92
14. Análise sensorial: exame olfativo do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	93
15. Análise sensorial: exame gustativo do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	95
16. Análise sensorial: exame olfato-gustativo, característica varietal e qualidade geral do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	97
17. Equações de regressão da densidade durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	112
18. Equações de regressão do pH durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	113

19. Equações de regressão da acidez total durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	114
20. Equações de regressão da acidez volátil durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	115
21. Equações de regressão do nitrogênio total durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	116
22. Equações de regressão do ácido málico durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	117
23. Equações de regressão do ácido láctico durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	118
24. Equações de regressão do ácido tartárico durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot elaborado na safra 2001.....	119

RESUMO

MANFROI, Luciano, D.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2002.

Avaliação do processo fermentativo e da composição de vinho Merlot elaborado com diferentes espécies de *Saccharomyces*, *Oenococcus* e *Lactobacillus*. Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva. Conselheiros: Luiz Antenor Rizzon e José Carlos Gomes.

O trabalho teve como objetivo determinar as características físico-químicas de mosto em fermentação e do vinho Merlot da safra 2001, elaborado com diferentes linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces* e bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Oenococcus* nas fermentações alcoólica e maloláctica. O vinho foi elaborado em microvinificação, com doze tratamentos e três repetições. As análises foram realizadas durante as três fases da fermentação alcoólica: esmagamento, descuba e término da fermentação alcoólica; e durante as três fases da fermentação maloláctica: início, durante a fermentação maloláctica e após a estabilização tartárica. O vinho acabado foi também analisado após 50 dias de engarrafamento, quanto a variáveis físico-químicas e sensoriais. Durante as fermentações alcoólica e maloláctica algumas variáveis, como densidade, acidez total, nitrogênio total e ácido málico sofreram uma diminuição em suas concentrações, ao contrário do pH, acidez volátil e ácido láctico que aumentaram no transcorrer do processo fermentativo. No vinho, algumas variáveis analisadas apresentaram diferenças significativas entre tratamentos, tais como densidade, teor alcoólico, acidez total, acidez volátil, acidez fixa, pH, I620, alcalinidade das cinzas, polifenóis totais, dióxido de enxofre livre e total, compostos voláteis e as aminas serotonina e espermidina. Os vinhos avaliados por meio de análise sensorial por provadores treinados foram classificados como sendo de qualidade mediana, talvez não em função do processo de elaboração, mas sim pela qualidade da uva nesta safra vitícola.

ABSTRACT

MANFROI, Luciano, D.S., Universidade Federal de Viçosa, November 2002.

Evaluation of the fermentative process and the composition of the Merlot wine processed with different species of *Saccharomyces*, *Oenococcus* and *Lactobacillus*. Adviser: Paulo Henrique Alves da Silva. Committee members: Luiz Antenor Rizzon and José Carlos Gomes.

The objective of this study was to determine the physico-chemical characteristics of the must under fermentation, as well as those of the Merlot wine from 2001 vintage, which was processed by different yeast strains of the *Saccharomyces* genus and the bacteria of the *Lactobacillus* and *Oenococcus* genera in the alcoholic and malolactic fermentations. The wine was processed through microvinification, using twelve treatments and three replicates. The analyses were accomplished during the three phases of the alcoholic fermentation: crushing, removal from the vessel, and the conclusion of the alcoholic fermentation; and during the three phases of the malolactic fermentation: beginning, during malolactic fermentation, and after the tartaric stabilization. The resulting wine was also analyzed, by several physico-chemical and sensory variables, 50 days after it was bottled. During the alcoholic and malolactic fermentations, density, total acidity, total nitrogen, and malic acid levels decreased, in contrast to the pH, volatile acidity, and lactic acid levels that increased over the fermentative process. In wine, there was significant difference among the treatments, on density, alcoholic content, total acidity, volatile acidity, fixed acidity, pH, I620, ash alkalinity, total polyphenols, total and free sulphur dioxide, volatile compounds, and the amines serotonin and spermidin. The wines evaluated through sensory analysis by trained panelists were classified as medium-quality wines, probably not as a function of the elaboration process but because of the quality of this vintage's.

1. INTRODUÇÃO

O segmento agroindustrial de produção de vinhos encontra-se hoje em um patamar diferenciado em relação a décadas passadas. O novo paradigma do setor vinícola é assegurar e ampliar mercados, em uma economia cada vez mais globalizada, onde a qualidade, produtividade, inovações tecnológicas, preço e marketing são fundamentais para a consolidação do produto. Novos centros produtores de distribuição local, regional ou internacional vão procurando se estabelecer, competindo por novos segmentos de mercado.

O vinho é definido como a bebida fermentada que provem exclusivamente de mosto de uvas frescas, transformado inicialmente pela ação de leveduras e posteriormente por bactérias maloláticas, em um processo simbiótico. É uma bebida de grande complexidade química devido à natureza das moléculas presentes e de suas reatividades.

Como todo alimento ou bebida fermentada, as etapas de fermentação são críticas para a obtenção de um produto de alta qualidade. Esta qualidade pode ser expressa por parâmetros químicos, físicos, microbiológicos e sensoriais.

Com relação aos processos fermentativos envolvidos na produção de vinhos, as suas eficiências podem ser estimadas pela produtividade, referenciada pelo consumo de substratos, formação de produtos e/ou balanceamento de compostos secundários. Estes compostos têm características específicas de volatilidade e de estabilidade, posicionando-os de maneira diferenciada com relação à participação no sabor e na conservação da bebida.

A adição de leveduras e bactérias selecionadas na etapa de fermentação é uma tendência universal em biotecnologia, proporcionando processos mais produtivos, controláveis e mais seguros em termos de qualidade. Algumas vias metabólicas indesejáveis dos microrganismos podem ser inibidas ou mesmo

suprimidas por manipulações de processo. Um grande desafio em segmentos agroalimentares mais tradicionais é adequar determinadas inovações de processo com algumas características de rusticidade, que também lhe agregaria valor, conferindo-lhe características artesanais.

O consumo moderado de vinho tem sido cada vez mais recomendado, sendo-lhe atribuído nos últimos tempos propriedades funcionais. Alguns compostos presentes em sua composição, acima de certos limites, podem entretanto, descaracterizar o produto e apresentar problemas à saúde. A presença destes compostos pode estar relacionada com a própria uva e/ou com o processo de vinificação. Pode ser também consequência da adição intencional de aditivos como dióxido de enxofre e ácido sórbico, contaminações do meio, aplicação de tratamentos fitossanitários na videira ou contaminação pelos equipamentos e produtos enológicos.

Vários compostos voláteis formados durante a fermentação alcoólica representam quantitativamente a maior parte dos constituintes do sabor, conferindo à bebida, atributos peculiares. Estes compostos são em sua grande maioria, de compostos secundários do metabolismo microbiano. O equilíbrio entre estas frações é responsável pela qualidade e aceitação dos vinhos.

O desenvolvimento de bactérias lácticas na fermentação maloláctica produz modificações na qualidade sensorial dos vinhos. Os mecanismos propostos são a remoção de compostos aromáticos pela ação do metabolismo e processos de adsorção pelas paredes celulares, produção de novos compostos voláteis pelo metabolismo de açúcares, aminoácidos e outros nutrientes, transformação metabólica de produtos do metabolismo secundário da uva e das leveduras.

Visando caracterizar e avaliar os processos fermentativos alcoólicos e malolácticos conduzidos com diferentes espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus*) e bactérias (*Oenococcus oeni* DSM 7008, *Oenococcus oeni* DSM 12923 e *Lactobacillus plantarum* DSM 4361) e suas implicações na composição do vinho Merlot, procedeu-se este trabalho.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Histórico da produção de uva e vinho

Não se pode apontar precisamente o local e a época em que o vinho foi elaborado pela primeira vez. Os arqueólogos aceitam o acúmulo de sementes de uva como evidência da elaboração de vinhos. As sementes mais antigas de uvas cultivadas foram descobertas na Geórgia (Rússia) e datam de 7000 – 5000 a.C. (datadas por marcação de carbono). Essas sementes foram classificadas como *Vitis vinifera* variedade *sativa*, o que serve de base para o argumento de que as uvas eram cultivadas e o vinho presumivelmente elaborado.

Os egípcios não foram os primeiros a elaborar vinho, mas certamente, foram os primeiros a saber como registrar e celebrar os detalhes da vinificação em suas pinturas que datam de 1000 a 3000 a.C.

Um fato interessante e que mostra o cuidado que os egípcios dedicavam ao vinho é a descoberta feita em 1922 na tumba do jovem faraó *Tutankamon* (1371 – 1352 a.C.). Foram encontradas 36 ânforas de vinho, algumas das quais continham inscrições da região, safra, nome do comerciante e até a inscrição “muito boa qualidade”.

Os romanos começaram a investir na agricultura e principalmente na vitivinicultura. Uma data muito importante no progresso de Roma foi 171 a.C. Começava uma nova era e apareciam os primeiros cultivos de uva e vinhos de qualidade. No império de Augusto (27 a.C. – 14 d.C.) a indústria do vinho estava estabelecida em toda a extensão da Itália que já exportava vinhos para a Grécia.

Sobre a origem da vitivinicultura na França existe uma verdadeira batalha entre os historiadores. Existem os que acreditam nos registros dos romanos e outros que acreditam que os Celtas estabeleceram a elaboração de vinhos na França. No

século II havia vinhedos na Borgogna; no século III, no vale do Loire; no século IV, nas regiões de Paris, Champagne, Mosela e Reno.

Da Europa, através de expedições colonizadoras, as videiras chegaram a outros continentes, especialmente nas Américas do Norte (Estados Unidos) e do Sul (Argentina, Chile e Brasil). A uva foi trazida para as Américas por Cristóvão Colombo na sua segunda viagem às Antilhas em 1493, espalhando-se, a seguir, para o México e sul dos Estados Unidos e as colônias espanholas da América do Sul.

No Brasil, as videiras foram trazidas da Ilha da Madeira em 1532 por Martim Afonso de Souza em sua capitania de São Vicente e plantadas por Brás Cubas, inicialmente no litoral paulista e depois, em 1551, na região de Tatuapé.

No Rio Grande do Sul foi introduzida em 1626, pelo jesuíta Roque Gonzáles que, em São Nicolau, quando houve a formação dos Sete Povos das Missões. O grande impulso na viticultura no Estado foi com a chegada dos imigrantes italianos nos anos de 1875 e 1914, estabelecendo-se nas colônias de Dona Izabel e Conde D´Eu e Caxias, hoje as cidades de Bento Gonçalves, Garibaldi e Caxias do Sul, respectivamente.

A uva Merlot é originária do Médoc na França, onde já era cultivada em 1850. Em 1920, era cultivada no município de Caxias do Sul e a partir de 1970 tornou-se uma das principais viníferas tintas do Rio Grande do Sul. É uma cultivar bem adaptada às condições de clima e solo do sul do Brasil, originando vinhos de alta qualidade, sendo muito utilizado em cortes com vinhos Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, principalmente (RIO GRANDE DO SUL, 2002).

Atualmente a cultivar Merlot ocupa um lugar de destaque entre as uvas viníferas produzidas na região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul. A produção de uva Merlot no ano de 2001 foi de 4961 t, enquanto que a produção de Cabernet Sauvignon foi de 3833 t e Cabernet Franc, de 2989 t, representando, respectivamente, 27,82%, 21,49% e 16,76% das uvas tintas viníferas produzidas no Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 2002).

2.2 – Leveduras etanologênicas

As leveduras são fungos unicelulares, cuja reprodução ocorre vegetativamente por brotamento. As exceções a esta forma de reprodução são as espécies do gênero *Schizosaccharomyces*, que se reproduzem por fissão, e *Sterigmatomyces* e *Fellomyces*, em forma de broto sobre pequenos talos (SMITH & YARROW, 199_).

As leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica originam-se de três fontes: da superfície da uva; da superfície dos equipamentos vinários; e da inoculação de leveduras selecionadas (FLEET & HEARD, 1994).

A fermentação alcoólica constitui uma das etapas mais importantes da elaboração de vinho, sendo conduzida pelas leveduras. Durante o processo fermentativo pode ocorrer um certo número de gêneros e espécies de leveduras, mas, a principal é a *Saccharomyces cerevisiae* (BARRE, 2000).

O mosto de uva constitui um meio complexo para as leveduras, que, agem sobre os constituintes do meio promovendo transformações físicas e bioquímicas. Durante a fermentação alcoólica, fase em que os açúcares são metabolizados, além do etanol e CO₂, ocorre a formação de álcoois superiores, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos graxos e ácidos orgânicos. A fermentação é amplamente dependente de três fatores básicos: da composição do mosto, da linhagem de levedura utilizada e das condições de processo.

2.2.1 – Metabolismos das leveduras etanologênicas

2.2.1.1 – Metabolismo de carbono de *Saccharomyces*

A glicólise é a via central do catabolismo da glicose de forma quase universal, não apenas em animais e vegetais, mas também na maioria dos microrganismos. A seqüência de reações da glicólise difere de uma espécie para outra apenas na forma em que sua velocidade é regulada e no destino metabólico do piruvato formado (LEHNINGER, 1995).

Existem três vias importantes que podem ser empreendidas pelo piruvato formado na glicólise. Nos organismos aeróbios a glicólise é apenas o primeiro estágio da degradação aeróbia completa da glicose a CO_2 e H_2O . A segunda via possível ao piruvato é a sua redução a lactato e a terceira via é a formação de etanol. Em alguns microrganismos, como a levedura, o piruvato formado da glicose pela via glicolítica é convertido anaerobicamente em etanol e CO_2 , um processo chamado fermentação alcoólica. Fermentação é um termo geral que significa degradação anaeróbia da glicose ou de outros substratos orgânicos em produtos variados, com o propósito de obtenção de energia na forma de ATP (LEHNINGER, 1995).

Dois importantes vias são utilizadas para o metabolismo das leveduras: via da hexose-difosfato (Embden-Meyerhof, Parnas - EMP) ou via glicolítica e a via de hexose-monofosfato. A via EMP converte glicose em piruvato sem perda de carbono, reduzindo duas moléculas de NAD^+ , gerando duas moléculas de ATP. O piruvato é utilizado como substrato nas reações aeróbias, sendo composto chave no metabolismo anabólico. A via glicolítica envolve a descarboxilação do piruvato a acetaldeído, sendo em seguida, reduzido a etanol pelo NADH formado na desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato, reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase (BOULTON et al., 1996).

Na via da hexose-monofosfato, por um processo oxidativo, a glicose é convertida em pentose e CO_2 , reduzindo duas moléculas de NADP^+ a NADPH. Em condições aeróbias o piruvato é oxidado na via dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ou Ciclo de Krebs a CO_2 e H_2O (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991; LEHNINGER, 1995).

O metabolismo dos açúcares do mosto, glicose e frutose, resultando em etanol, é um ponto de importância central na produção de vinho. A composição do mosto em açúcares, é dependente da variedade de uva, e sua concentração varia entre $140,0 \text{ g L}^{-1}$ e $260,0 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares totais (BISSON, 1994).

Em muitos microrganismos, 68% a 80% da glicose é metabolizada na via glicolítica (EMP). No caso da levedura *S. cerevisiae*, mais de 95% da glicose é metabolizada nessa mesma via (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

A fermentação do mosto da uva é tipicamente anaeróbia. O oxigênio molecular disponível no mosto processado é rapidamente consumido pelos microrganismos presentes. A inoculação da levedura *Saccharomyces*, permite que a

mesma tenha domínio, com maior rapidez, da fermentação alcoólica em relação aos outros microrganismos presentes (HENSCHKE & JIRANEK, 1994).

Aproximadamente 50% do açúcar disponível é consumido durante a fase de crescimento exponencial das células e o restante é consumido na fase estacionária. A concentração de nitrogênio no mosto afeta o número de células presentes e regula o fluxo de carbono na glicólise (BOULTON et al., 1996).

Quando o mosto de uva é inoculado com leveduras e o meio estiver em aerobiose, o etanol não é imediatamente produzido. Enquanto as células estão respirando, a atividade das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase não é totalmente expressada, pois, ambas são induzidas pela glicose. Em conseqüência, outros compostos são produzidos durante esta fase inicial da fermentação, como glicerol, piruvato, succinato e outros ácidos orgânicos (HENSCHKE & JIRANEK, 1994).

2.2.1.2 – Metabolismo de nitrogênio de *Saccharomyces*

As substâncias nitrogenadas são constituídas pelo nitrogênio amoniacal, os aminoácidos, os polipeptídios e as proteínas. As leveduras são capazes de sintetizar todos os compostos nitrogenados que necessitam a partir do nitrogênio amoniacal que representa a forma nitrogenada mais facilmente assimilável (USSEGLIO-TOMASSET, 1998).

A presença de determinados aminoácidos como substrato facilita a fermentação, já que as leveduras podem seguir por três vias de assimilação de nitrogênio (USSEGLIO-TOMASSET, 1998):

1) assimilação direta dos aminoácidos: a maior proporção dos aminoácidos é utilizada diretamente, e a desaminação dos aminoácidos é realizada pelas leveduras somente quando o mosto não possui proporções adequadas para a nutrição nitrogenada das leveduras;

2) liberação de nitrogênio amoniacal por meio de um mecanismo de oxirredução: existem aminoácidos que se comportam como doadores de hidrogênio e outros como receptores e isso explica por que uma mistura de aminoácidos é mais eficaz como meio de alimentação nitrogenada, comparada com qualquer de seus

componentes individualizados. Como consequência dessas reações, os aminoácidos tornam-se fontes de nitrogênio amoniacal facilmente assimiláveis.

3) assimilação de nitrogênio por desaminação e descarboxilação, com formação de álcoois superiores: ao cetoácido, que será posteriormente descarboxilado e reduzido, se chega através de reação de transaminação que implica outro cetoácido, sendo sobre esse, a transferência do grupo amina: o ácido típico que participa nessas reações é o α -ceto-glutâmico.

As leveduras utilizam, principalmente, os aminoácidos presentes no meio como fonte de nitrogênio. Este nitrogênio assimilado pelas células é utilizado para a biossíntese de mais aminoácidos que serão utilizados para a síntese de proteínas. Quando os aminoácidos entram nas células da levedura, um sistema de transaminase remove o grupamento amina e o esqueleto de carbono restante é metabolizado. O glutamato formado pode ser usado como um doador de grupos amina para sintetizar outros aminoácidos de esqueletos de carbono formados através de vias anabólicas. Os compostos nitrogenados são essenciais na fase de crescimento e metabolismo das leveduras pois são rapidamente assimilados junto com outros nutrientes necessários para a atividade anabólica. A cinética da fermentação e a produção de aromas e metabólitos secundários, podem ser, em parte, dependentes da qualidade e quantidade de nitrogênio do mosto (HENSCHKE & JIRANEK, 1994; PRIEST & CAMPBELL, 1996; VOGT et al., 1984).

A eficiência metabólica das fontes de nitrogênio, depende da expressão, regulação e eficiência dos mecanismos de transporte, como também, da regulação dos processos anabólicos e catabólicos das células (BOULTON et al., 1996).

O consumo de nitrogênio pelas leveduras acontece no início da fermentação, geralmente, antes da formação de 5% de etanol acumulado no meio. Os subprodutos secundários do metabolismo de carboidratos e do nitrogênio que afetam a composição e aroma do vinho são produzidos e excretados durante esta fase (HENSCHKE & JIRANEK, 1994).

Muitos fatores afetam a assimilação dos compostos nitrogenados, dentre eles, as condições da cultura, composição do meio e linhagem da levedura. O pH baixo (3,25) afeta o sistema de transporte ativo, podendo reduzir em 50% a produção de biomassa pelas células, quando comparado com pH 4,0. A tolerância

das leveduras ao etanol é um fenômeno complexo. O etanol pode afetar a atividade de transporte por mecanismos envolvendo redução no número de carreadores localizados na membrana plasmática. Também pode desativar a enzima aminoácido permease por inibição seletiva de componentes do transporte de proteínas. A atividade dos carreadores no transporte ativo é dependente da temperatura, pois a relação de acumulação de aminoácidos é diminuída a baixas temperaturas. A absorção de aminoácidos como valina, leucina e isoleucina, são, progressivamente, reduzidas com aumento da pressão de dióxido de carbono no meio. No caso das leveduras, a diferença entre as linhagens está na utilização de determinados aminoácidos específicos e a demanda de nitrogênio total (HENSCHKE & JIRANEK, 1994).

Os compostos nitrogenados acumulados, são degradados em um ou dois produtos finais, íon amônio ou glutamato. Várias vias, como a degradação da purina, citosina, aminas, serina, fenilalanina e outros, geram íon amônio como produto final. Outras vias como a degradação da prolina, alanina, aspartato, lisina e outros, geram glutamato diretamente. No caso do amônio, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato dependente de glutamato desidrogenase (NADP-GDH) catalisa a formação de glutamato a partir do amônio, sendo este, predominante doador de nitrogênio em muitas reações de biossíntese. A reação inversa, ou seja, a formação de amônio a partir de glutamato, é catalisada pela NAD-GDH. Estas considerações enfatizam a posição central do amônio e glutamato, à interface entre reações de catabolismo e anabolismo do nitrogênio (COOPER, 1982; HENSCHKE & JIRANEK, 1994).

A partir dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina, as leveduras geram pequenas concentrações de álcoois superiores ou de óleo fusel, que aparecem como subprodutos em toda a fermentação alcoólica (VOGT et al., 1984).

2.3 – Influência do meio de crescimento na fermentação alcoólica

2.3.1 – Efeitos do oxigênio sobre a fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica ocorre em semi-anaerobiose, pois a concentração de oxigênio disponível no mosto ao iniciar a fermentação é inferior a 10 mg de O₂ L⁻¹.

O metabolismo da *S. cerevisiae* em tais condições é estritamente fermentativo (SALMON, 2000).

2.3.2 – Efeitos da concentração de açúcares sobre a fermentação alcoólica

O mosto da uva caracteriza-se por possuir uma alta concentração de açúcares fermentescíveis (de 140,0 g L⁻¹ a 260,0 g L⁻¹, segundo o grau de maturação), distribuídos entre glicose e frutose em quantidades equivalentes (SALMON, 2000). Concentrações elevadas de açúcares, como no caso de mosto concentrado, pode inibir a fermentação alcoólica.

2.3.3 – Efeitos do pH e ácidos orgânicos sobre a fermentação alcoólica

O mosto de uva se caracteriza por uma elevada acidez (pH 3,0 a 3,5). Em condições de fermentação, mesmo que o meio externo seja relativamente ácido, o pH intracelular se mantém num valor próximo à neutralidade de maneira ativa pela levedura. Além da difusão passiva dos prótons através da membrana plasmática que contribui para acidificar o citoplasma, ocorre a influência de outros mecanismos físico-químicos: o ácido acético e outros ácidos orgânicos fracos, normalmente produzidos durante a fermentação alcoólica como subprodutos fermentativos, podem acumular-se no interior da célula devido a diferenças de pH transmembranares; sua forma dissociada difunde livremente através da membrana plasmática. No interior da célula, esses ácidos fracos se dissociam podendo contribuir em grande parte para baixar o pH intracelular. Tal acidificação intracelular deverá ser compensada pelo aumento do funcionamento da ATPase bomba de prótons da membrana plasmática, com a finalidade de preservar a viabilidade celular. Esse efeito sobre o pH intracelular é especialmente reforçado por elevadas concentrações de etanol e um pH extracelular baixo (SALMON, 2000).

Os fatores que interferem na variação do pH na fermentação alcoólica estão relacionados com a liberação de ácidos orgânicos e de minerais da película

para o mosto, especialmente o potássio, e a síntese de etanol favorece a insolubilização e posterior precipitação do bitartarato de potássio pelo tratamento físico pelo frio, o que determina a elevação do pH do vinho (RIZZON & MIELE, 2002); e durante a fermentação maloláctica, a transformação do ácido málico pelas bactérias lácticas faz com que o pH aumente e ao mesmo tempo favoreça a precipitação do bitartarato de potássio. Por outro lado, a dissolução dos ácidos tartárico, málico e cítrico da película para o mosto, bem como a formação de outros ácidos na fermentação alcoólica, agem de maneira contrária, isto é, impedem o aumento mais expressivo do pH (RIZZON, 1985; RIZZON et al., 1998).

Os ácidos orgânicos exercem influência sobre o pH do mosto, representando 90% dos ácidos constituintes da uva. O pH depende muito do ácido tartárico, sendo o mais resistente dos três ácidos orgânicos da uva à ação das bactérias. Sua concentração diminui por precipitação, na forma de bitartarato de potássio e de tartarato neutro de cálcio, provocado pelo aumento do álcool e da diminuição da temperatura (PEYNAUD, 1984), em um processo chamado de estabilização tartárica.

2.3.4 – Efeitos da temperatura sobre a fermentação alcoólica

As leveduras que não são do gênero *Saccharomyces* na fermentação do vinho, são significativamente influenciadas pela temperatura, e o aumento dessa, provoca diminuição da atividade fermentativa. Para *S. cerevisiae* os melhores resultados de atividade fermentativa foram encontrados a temperatura de 25°C (HEARD & FLEET, 1988). Segundo RAINIERI et al. (1998), a temperatura ótima de crescimento de *S. cerevisiae* é de 30°C e a temperatura máxima de crescimento é de 37°C e a *S. bayanus*, tem o seu ótimo em temperaturas menores que 30°C e a temperatura máxima de crescimento menor que 37°C. Segundo PEYNAUD (1984), a rapidez da transformação do açúcar em álcool é maior com o aumento da temperatura, até um certo limite. A fermentação alcoólica ocorre mais rapidamente a 30°C do que 25°C e 20°C, sendo que a temperatura ideal situa-se entre 25°C e 30°C.

Em altas temperaturas, a mortalidade celular estaria ligada a fenômenos de desnaturação protéica da membrana interna da mitocôndria. A temperaturas baixas ou moderadas, a acidificação intracelular parece ser o mecanismo dessa indução da mortalidade. Por outro lado, deve-se ressaltar que uma diminuição da temperatura afeta especialmente o funcionamento da ATPase da membrana (SALMON, 2000).

2.3.5 – Efeitos do etanol sobre o crescimento de leveduras

Os fosfolípidios da membrana exercem importante papel na tolerância ao álcool. O etanol parece atuar como solvente em componentes da membrana celular e inibidor de enzimas específicas, como por exemplo, a hexoquinase (CHARPENTIER, 1994).

A concentração mínima de açúcares, que resulta na produção de concentrações inibitórias de etanol, pode variar de acordo com as condições nas quais o crescimento foi promovido. Na concentração inicial de 100,0 g L⁻¹ de açúcar fermentescível, foi encontrado 94% de conversão em relação ao teórico, enquanto a partir de 200,0 g L⁻¹ de açúcar fermentescível foi obtido 83% de conversão com presença de glicose residual no meio fermentado.

A membrana celular sofre influência preponderante sobre a tolerância ao etanol. Uma tolerância elevada ao etanol por *S. pretoriensis*, utilizada na fermentação de vinhos, foi encontrada por JIMENEZ & BENITEX (1987) em células que haviam crescido previamente em meio com etanol, melhorando eficientemente a tolerância em nível de membrana celular.

A composição da membrana plasmática de *Saccharomyces* inclui carboidratos (83%), proteínas (10%), lipídios (3%) na forma de fosfolípidios (0,7%), ácidos graxos e esteróis (0,45%) e ácido ribonucléico (0,3%) e desoxirribonucléico (0,04%) (REED & PEPLER, 1973).

2.4 – Bactérias lácticas em produção de vinhos

As bactérias lácticas são Gram positivas, não esporuladas, microaerófilas, catalase negativas, cujo produto principal da fermentação dos açúcares é o ácido láctico. As bactérias malolácticas são bactérias lácticas capazes de degradar o ácido málico transformando-o em ácido láctico (FLEET, 1994; USSEGLIO-TOMASSET, 1998).

As bactérias lácticas foram separadas em dois grupos: 1) Bacilos Gram-positivos, podendo ser móveis ou imóveis. Possuem metabolismo fermentativo, podendo ser homo ou heteroláctico (gênero *Lactobacillus*); 2) Cocos Gram-positivos, células esféricas ou ovóides, não móveis, não esporuladas, sendo anaeróbios facultativos (gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*) (LONVAUD-FUNEL, 2000; SIQUEIRA, 1995).

Nos mostos e vinhos, as bactérias lácticas se multiplicam em número limitado de espécies devido especialmente ao meio seletivo por seu pH ácido, sua composição em elementos nutritivos, e no caso do vinho, a quantidade de etanol (VALLART et al., 1992). Somente os gêneros *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* possuem capacidade de desenvolver-se no vinho e de realizar a fermentação maloláctica. Dentro do gênero *Pediococcus*, somente as espécies *cerevisiae*, *parvulus* e *pentosaceus* são encontradas no vinho. No gênero *Lactobacillus*, as espécies mais encontradas são *plantarum* e *casei* e no gênero *Leuconostoc*, *oenos* e *mesenteroides* são as principais espécies presentes no mosto após o esmagamento da uva. Neste caso, a *Leuconostoc oenos* é a principal espécie responsável pela fermentação maloláctica, sendo reconhecida como a bactéria mais resistente ao álcool e ao pH baixo do vinho. Nos vinhos com pH alto a *Pediococcus* pode crescer e conduzir a fermentação maloláctica. O desenvolvimento da fermentação maloláctica pode finalizar com resultados diferenciados, e, portanto, influenciando na conservação do vinho, segundo a natureza das bactérias lácticas (FLANZY, 2000; PEYNAUD, 1984; WIBOWO et al., 1985).

Os gêneros normalmente encontrados nos vinho são (Tabela 1): *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus*. Na realidade, *Oenococcus*

oeni é um gênero que substitui a *Leuconostoc oenos* (CAVIN et al., 2000; FLEET, 1994).

As bactérias lácticas são agentes biológicos importantes na elaboração de vinho porque são responsáveis pela realização, principalmente, da fermentação maloláctica, podendo além desta, causarem outras contaminações. Estas bactérias encontradas no vinho, estão presentes na superfície das bagas da uva, sobre as folhas da videira, no solo e também no material utilizado durante a vinificação. A população inicial de bactérias lácticas encontrada no mosto da uva varia de 10^2 a 10^4 células mL^{-1} . No início da fermentação maloláctica, sua concentração é de aproximadamente de 10^3 células mL^{-1} , aumentando progressivamente até chegar a 10^6 células mL^{-1} em plena fermentação maloláctica (FLEET, 1994; LONVAUD-FUNEL, 2000; PRAHL et al., 1994; VERSARI et al., 1999).

TABELA 1. Principais bactérias lácticas encontradas em mostos e vinhos.

Gêneros	Natureza da fermentação	Espécies	Natureza do Ácido Láctico
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativo	<i>damnosus</i>	L(+) D(-)
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativo	<i>parvulus</i>	L(+) D(-)
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativo	<i>pentosaceus</i>	L(+) D(-)
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativo	<i>mesenteroides</i>	D(-)
<i>Oenococcus</i>	Heterofermentativo	<i>oeni</i>	D(-)
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentativo	<i>mali</i>	L(+) ou L(+) D(-)
<i>Lactobacillus</i>	Heterofermentativo	<i>casei</i>	L(+)
	Facultativo		
<i>Lactobacillus</i>	Heterofermentativo	<i>plantarum</i>	L(+) D(-)
	Facultativo		
<i>Lactobacillus</i>	Heterofermentativo	<i>brevis</i>	L(+) D(-)
<i>Lactobacillus</i>	Heterofermentativo	<i>buchneri</i>	L(+) D(-)
<i>Lactobacillus</i>	Heterofermentativo	<i>fermentum</i>	L(+) D(-)
<i>Lactobacillus</i>	Heterofermentativo	<i>fructivorans</i>	L(+) D(-)
<i>Lactobacillus</i>	Heterofermentativo	<i>hilgardii</i>	L(+) D(-)

Fonte: CAVIN et al., 2000.

2.4.1 – Metabolismos das bactérias lácticas

2.4.1.1 – Metabolismo de carbono de bactérias lácticas na fermentação maloláctica

O processo energético principal é a fermentação láctica, podendo ser realizada por via homofermentativa ou heterofermentativa. A homofermentação é realizada por bactérias lácticas do gênero *Pediococcus* e algumas do gênero *Lactobacillus* a partir da glicose, com a redução do piruvato em lactato pela lactatodesidrogenase pela via EMP (glicolítica) (CAVIN et al., 2000). Enquanto que as espécies do gênero *Leuconostoc* e algumas de *Lactobacillus* que não possuem as enzimas chaves (aldolases), metabolizam as hexoses pela via fosfocetolase (heterofermentativas) (HENICK-KLING, 1994).

A heterofermentação da glicose se realiza por meio da via fosfocetolase (via das pentoses). Depois da descarboxilação do açúcar, ocorre a formação intermediária de uma pentose fosfato (xilulose-5-P) que é transformada pela enzima fosfocetolase, formando uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato. A partir do gliceraldeído-3-fosfato formará piruvato e por final lactato; e a partir de acetil-fosfato, vai formar acetil CoA, acetaldeído e por final etanol, por meio da enzima acetaldeído desidrogenase e etanol desidrogenase, respectivamente (CAVIN et al., 2000).

Também durante a heterofermentação da glicose, ocorre a formação de ácido acético e paralelamente a redução da frutose em manitol. As pentoses são fermentadas pelas bactérias heterofermentativas e por algumas homofermentativas (heterofermentativas facultativas) que possuem a enzima fosfocetolase, fundamental para a heterofermentação (CAVIN et al., 2000).

2.4.1.2 – Metabolismo de nitrogênio de bactérias lácticas na fermentação maloláctica

A fonte nitrogenada mais importante para o crescimento das bactérias lácticas do vinho está constituída pelos aminoácidos ou peptídios de baixo peso

molecular. A bactéria *O. oeni* necessita de maior quantidade de aminoácidos do que outras espécies de bactérias lácticas para seu metabolismo. Durante a fermentação maloláctica, a concentração de substâncias nitrogenadas é significativamente modificada. Alguns aminoácidos diminuem (arginina, glicina, fenilalanina, histidina, α -alanina e serina), enquanto que outros aumentam (ácidos aspártico e glutâmico, leucina, metionina, isoleucina e triptofano) (FEUILLAT, 2000).

Entre os compostos nitrogenados do vinho, os peptídios, mais precisamente os oligopeptídios com peso molecular inferior a 1000 Da, são metabolizados pelas bactérias (FEUILLAT, 2000).

2.5 – Processo de fermentação maloláctica em vinhos

A realização da fermentação maloláctica é promovida pelo desenvolvimento de bactérias lácticas, células que têm capacidade de transformar o ácido málico em ácido láctico e outros compostos secundários como ácido acético, ácido succínico, glicerol, manitol e outros poliálcoois, gás carbônico e outros (PEYNAUD, 1984).

A fermentação maloláctica é um processo metabólico de descarboxilação do ácido L(-)málico resultando em ácido L(+)láctico e dióxido de carbono, realizada por bactérias lácticas, presentes naturalmente nos vinhos (USSEGLIO-TOMASSET, 1998).

São conhecidas diversas enzimas capazes de transformar o ácido málico com produção de ácido láctico, mas particularmente, somente as enzimas malatodesidrogenase, málica e maloláctica promovem esta transformação. As bactérias lácticas do vinho possuem as enzimas dextro(-) e as levo(+) lactodesidrogenases, assim, na fermentação dos açúcares são capazes de reduzir o ácido pirúvico em ácido D(-) e L(+)láctico. Porém na fermentação maloláctica, ocorre somente a transformação bacteriana do ácido málico em exclusivamente L(+)láctico. Desta maneira pode-se afirmar que as enzimas lactodesidrogenases não estão envolvidas na fermentação maloláctica. A maioria das bactérias lácticas encontradas nos vinhos podem realizar a fermentação maloláctica, degradando o ácido L(-)málico em ácido L(+)láctico e dióxido de carbono (*Tabela 1*). O metabolismo do ácido

málico pelas bactérias lácticas pode ser realizado por três vias diferentes. Na primeira via as bactérias que possuem a enzima malato desidrogenase, transformam o ácido málico em ácido oxalacético na presença de NAD, sendo após descarboxilado formando ácido D(-) e L(+)láctico. Esta enzima não é muito ativa em vinhos, pois seu pH ótimo é muito alto, sendo esta rota pouco utilizada pelas bactérias lácticas (USSEGLIO-TOMASSET, 1998).

Na segunda via, as bactérias que possuem a enzima málica transformam o ácido málico inicialmente em ácido pirúvico e gás carbônico na presença de coenzima NAD e íons Mn^{++} ; em seguida, o ácido pirúvico é reduzido a ácido D(-) e L(+)láctico pela lactodesidrogenase (LDH) com associação de NADH, formado na primeira reação (HENICK-KLING, 1994; USSEGLIO-TOMASSET, 1998).

Na terceira via, a degradação do ácido málico ocorre pela descarboxilação deste pela enzima maloláctica formando ácido L(+)láctico. A enzima maloláctica tem peso molecular aproximado de 235.000, ponto isoelétrico de 4,35, constitutiva em 60% das bactérias lácticas heterofermentativa e induzida em outras. Esta enzima é induzida unicamente em presença de glicose, tem um pH ótimo entre 5,6 e 6,1, e sua atividade é dependente de NAD e Mn^{++} (GARCÍA et al., 1992; LONVAUD-FUNEL, 2000).

Do ponto de vista energético a fermentação maloláctica não libera energia já que se produz o desprendimento de um átomo de carbono no seu grau máximo de oxidação (CO_2). A transformação é endoenergética, não colocando nenhuma energia a disposição da célula, pois esta, deve procurar a energia necessária nos açúcares presentes no meio (USSEGLIO-TOMASSET, 1998).

O ácido málico, sendo o segundo ácido orgânico em abundância no vinho recém elaborado, colabora muito para a acidez deste produto. A fermentação maloláctica é o principal meio de reduzir esta acidez, o que a torna um processo de importância crucial na elaboração de vinhos. Esta fermentação apresenta outros efeitos benéficos à qualidade do vinho, bem como efeitos indesejáveis em determinados casos (AVILA, 1995).

A fermentação maloláctica é importante na elaboração de vinhos por três motivos: 1) promove a desacidificação diminuindo a sensação ácida e a sensação de álcool; 2) provoca a modificação no aroma, removendo o aroma vegetativo/herbáceo

e enriquecendo com aroma floral e de frutas vermelhas; 3) contribui para a estabilidade microbiana, degradando o ácido málico e alguns açúcares residuais, produzindo agentes antimicrobianos pelas bactérias lácticas chamados bacteriocinas (HENICK-KLING, 1994; MARTINEAU & HENICK-KLING, 1995; PRAHL et al., 1994; THÉODORE & GERLAND, 1998; VERSARI et al., 1999).

A dificuldade das bactérias lácticas de se desenvolverem durante a fermentação alcoólica tem sido explicada, em termos, pelo efeito antagônico do crescimento das leveduras, através da competição pelos nutrientes e produção de substâncias que inibem o crescimento bacteriano. O consumo de arginina e outros aminoácidos pelas leveduras e a produção de álcool são responsáveis pela inibição das bactérias lácticas, mas outros fatores podem estar envolvidos. Os efeitos antagônicos entre leveduras e bactérias lácticas dependem ainda das espécies e cepas dos microrganismos utilizados (WIBOWO et al., 1985). Por exemplo, a realização da fermentação maloláctica é facilitada quando a fermentação alcoólica é conduzida por *S. cerevisiae* do que *S. bayanus* (RIBÉREAU-GAYON, 1985).

Os ácidos graxos presentes no vinho são substâncias que inibem ou retardam o crescimento das bactérias lácticas, especialmente os ácidos octanóico e decanóico, que provém do metabolismo das leveduras. Em concentrações de 20 mg L⁻¹ a 30 mg L⁻¹ podem inibir a fermentação maloláctica do vinho (CAVIN et al., 2000).

As leveduras podem estimular o crescimento de bactérias lácticas em vinhos. Este efeito varia conforme o gênero e espécie da levedura. As vitaminas e aminoácidos excretados durante o metabolismo das leveduras no final da fermentação alcoólica podem auxiliar no metabolismo bacteriano. Um contato prolongado do vinho com a borra provoca um aumento na concentração de aminoácidos no vinho pela autólise da levedura, favorecendo o crescimento das bactérias lácticas.

2.6 – Influência do meio de crescimento na fermentação maloláctica

Do ponto de vista nutricional, o mosto da uva contém todos os elementos necessários para o crescimento de bactérias, podendo ocorrer algumas limitações

devido ao crescimento de outros microrganismos contaminantes que podem estar presentes no vinho (CAVIN et al., 2000).

Às características do meio de cultivo da uva (pluviometria, maturação e estado sanitário) e às práticas culturais (natureza do solo, porta-enxerto, fertilização) são atribuídas grande importância nas concentrações em ácidos orgânicos e compostos nutricionais do mosto (PILATTE & NYGAARD, 1999).

2.6.1 – Efeitos do pH sobre a fermentação maloláctica

Um fator primordial para a realização da fermentação maloláctica é o pH. A acidez possui efeito seletivo sobre espécies de bactérias e sobre os componentes suscetíveis de serem degradados. Os gêneros e espécies de bactérias se caracterizam pela atividade diferenciada em produzir fermentação maloláctica pura, pois os valores de pH ótimo para a degradação do ácido málico e dos açúcares são diferentes. Para os cocos, que são os agentes mais indicados a esta transformação, o pH para degradação do ácido málico é mais baixo que o pH para a transformação dos açúcares. A pH 3,0 o ácido málico é metabolizado enquanto que a glicose não sofre degradação. Quanto maior for o distanciamento entre estes dois valores, melhor será a adaptação das bactérias à fermentação maloláctica nos vinhos. Ao contrário, os bacilos degradam os açúcares em pH mais baixo (3,0). O pH incide de maneira importante sobre a dissociação dos ácidos e em consequência sobre seu poder inibidor (CAVIN et al., 2000; PEYNAUD, 1984).

O pH do meio exerce influência, principalmente, na fase *lag*, na taxa de crescimento das bactérias lácticas e na duração da fermentação maloláctica, nas espécies que crescem no meio (vinho), na ação metabólica das espécies e na sobrevivência das bactérias lácticas. O pH ótimo para multiplicação das bactérias lácticas situa-se entre 4,2 a 4,5. Para a degradação do ácido málico durante a fermentação maloláctica, o pH ótimo para os bacilos situa-se entre 3,2 e 3,5, sendo inibidos a pH 3,0; já para os cocos situa-se entre 3,0 e 4,0 sendo inibida a pH 4,5 (HENICK-KLING, 1994).

Uma ligeira diminuição da acidez na uva facilita o desencadeamento da fermentação maloláctica. Esta desacidificação pode ser praticada em um pequeno

volume, para depois ser utilizado como pé-de-cuba ou inóculo. Este procedimento tecnológico deve limitar-se a elevar o pH do mosto (PEYNAUD, 1984).

Normalmente os vinhos que possuem pH inferior a 3,5 não suportam o crescimento de bactérias do gênero *Pediococcus* e *Lactobacillus*, portanto, o meio fica dominado pela *O. oeni*. Em pH inferior a 3,0 impede todo desenvolvimento das bactérias lácticas no vinho, sendo a bactéria *O. oeni*, considerada a espécie mais tolerante ao pH ácido (CAVIN et al., 2000).

2.6.2 – Efeitos da temperatura sobre a fermentação maloláctica

A influência da temperatura na fermentação maloláctica é extremamente importante. Quando a fermentação maloláctica é realizada em condições de meio exatamente iguais, a transformação do ácido málico do vinho realiza-se com maior rapidez na temperatura entre 20°C a 25°C, e mais lenta a 15°C e a 30°C, podendo ser interrompida com temperaturas acima de 30°C. A produção máxima de biomassa pela bactéria *O. oeni* ocorreu em substrato contendo 0% a 8% de etanol a temperatura de 22,1°C (HENICK-KLING, 1994; PEYNAUD, 1984; RIBÉREAU-GAYON et al., 1976).

A temperatura ótima de crescimento para o gênero *Leuconostoc* está entre 20°C e 30°C, para a *O. oeni* entre 18°C e 24°C; para *P. cerevisiae*, 25°C e para os *Lactobacillus*, entre 30°C e 40°C (HENICK-KLING, 1994).

A fermentação do ácido málico é lenta abaixo de 15°C, sendo realizada em alguns dias a 20°C, algumas semanas a 13°C e alguns meses abaixo de 12°C. Uma vez iniciada a fermentação maloláctica, ela pode ser conduzida com temperaturas abaixo de 10°C (PEYNAUD, 1984).

2.6.3 – Efeitos da aeração sobre a fermentação maloláctica

A aeração favorece a multiplicação das bactérias lácticas. A saturação do vinho recém elaborado em ar faz com que a fermentação maloláctica inicie-se mais rapidamente. Ao contrário, a saturação com oxigênio puro, atrasa o início da fermentação maloláctica, sem impedi-la ao todo (PEYNAUD, 1984).

As bactérias lácticas são microaerófilas, indicando que necessitam de pequenas doses de oxigênio. Nas bactérias heterolácticas a presença de oxigênio molecular estimula o seu crescimento, permitindo a reoxidação do NADPH (BOULTON et al., 1996), como por exemplo, a *Leuconostoc gracile*, favorecida por pequenas quantidades de oxigênio (PEYNAUD, 1984).

A influência da aeração no meio fermentativo é que vai definir quais os produtos finais produzidos pela degradação da glicose. Durante a fermentação maloláctica com *O. oeni*, condições de anaerobiose favorecem a degradação do ácido málico. Ao contrário, quando condições de aerobiose estão presentes, ocorre um aumento na produção de biomassa pelas bactérias e aumento na concentração de ácido acético, glicerol, arabitol e eritritol (FIRME et al., 1994).

2.6.4 – Efeitos de nutrientes sobre a fermentação maloláctica

As bactérias malolácticas possuem exigências nutritivas maiores que as leveduras, sobretudo de aminoácidos presentes no vinho. Geralmente encontram-se no vinho quantidades suficientes de diversas vitaminas, como ácidos pantotênico e nicotínico, tiamina e biotina, que atuam como cofatores de crescimento. As necessidades básicas das bactérias malolácticas são uma base nitrogenada, vitaminas, aminoácidos e minerais, variando segundo as cepas utilizadas (HENICK-KLING, 1994; PEYNAUD, 1984; PILATTE & NYGAARD, 1999).

As fontes mais importantes de nutrientes para o crescimento das bactérias lácticas são os aminoácidos livres e os peptídios com peso molecular abaixo de 1000. Durante a fermentação maloláctica a concentração de alguns aminoácidos diminui e de outros aumenta, sendo que ao final da fermentação maloláctica a concentração de aminoácidos total é menor que a inicial (HENICK-KLING, 1994). Os aminoácidos, tais como, arginina, ácido glutâmico, cisteína, isoleucina, triptofano são indispensáveis ao metabolismo bacteriano. A leucina, cisteína, valina, metionina, fenilalanina, tirosina e serina, também favorecem o crescimento, dependendo da espécie utilizada (CAVIN et al., 2000; FOURCASSIE et al., 1992).

A necessidade dos cátions Mn^{++} , Mg^{++} , K^+ e Na^+ no meio fermentativo é muito grande porque atuam como cofatores enzimáticos. O vinho como meio de

crescimento sempre satisfaz perfeitamente todas as necessidades de sobrevivência das bactérias (HENICK-KLING, 1994; PEYNAUD, 1984; PILATTE & NYGAARD, 1999).

2.6.5 – Efeitos do etanol sobre a fermentação maloláctica

A fermentação maloláctica acontece mais favoravelmente em vinhos com baixa graduação alcoólica. Naqueles vinhos em que a graduação alcoólica é maior, o período de fase *lag* da bactéria é mais prolongado, a população bacteriana final é menor e a degradação do ácido málico torna-se mais lenta (PEYNAUD, 1984).

As bactérias malolácticas são necessariamente resistentes ao álcool, já que se desenvolvem em vinhos onde a graduação alcoólica situa-se entre 10% e 13%. Porém sua multiplicação fica comprometida com a presença do álcool, principalmente com graduações superiores a 10°GL. As bactérias *Oenococcus* e *Pediococcus* toleram concentrações máximas de 12% a 14% de álcool. A estas concentrações, o álcool é um fator limitante do crescimento bacteriano e o principal obstáculo para o êxito da fermentação maloláctica. Já a *L. plantarum*, pode paralisar sua atividade em concentrações de 5% a 6% de etanol (BOULTON et al., 1996; HENICK-KLING, 1994; PEYNAUD, 1984).

O etanol pode atuar nas bactérias alterando a permeabilidade e composição lipídica das membranas celulares e/ou pode afetar indiretamente a fermentação maloláctica por seu efeito sobre a atividade das enzimas envolvidas na degradação do ácido málico (WIBOWO et al., 1985).

Os microrganismos na forma de cocos são mais sensíveis ao álcool que bacilos. Observa-se fortes tolerâncias ao álcool de certas cepas de lactobacilos capazes de desenvolver em vinhos com 18°GL a 20°GL, os quais tornam-se alterados pela fermentação manítica (PEYNAUD, 1984).

2.6.6 – Efeitos do dióxido de enxofre sobre a fermentação maloláctica

O dióxido de enxofre é o principal composto utilizado para inibir o crescimento indesejável das bactérias lácticas. O pH influencia a eficiência do SO₂

como agente bactericida, regulando o equilíbrio entre o SO₂ ativo e o SO₂ livre. A forma ativa difunde livremente na célula e se encontra na forma de HSO₃⁻ (CAVIN et al., 2000). O dióxido de enxofre age consideravelmente as bactérias lácticas, sendo estas muito mais sensíveis que as leveduras. A adição de dióxido de enxofre no mosto ou na própria uva pode retardar a fermentação maloláctica em diferentes intensidades dependendo da dose empregada. Desta influência do dióxido de enxofre sobre a evolução da fermentação maloláctica, e portanto, sobre a acidez fixa que terá o vinho, se utiliza uma regra geral de vinificação: o sulfitado e todo o comportamento da vinificação, dependem da acidez da uva.

Em mostos e vinhos a forma ativa de sulfitação que predomina é o íon bissulfito (HSO₃⁻). Este, rapidamente estabelece o equilíbrio da combinação bissulfítica com os açúcares (60% aproximadamente), e durante a fermentação, com os compostos carbonílicos e metabólitos intermediários. Esta fração de SO₂ combinado, formando compostos sulfonados perde sua ação antimicrobiana de 5 a 10 vezes em relação ao SO₂ livre (BOULTON et al., 1996).

A fração de SO₂ livre se encontra na maior parte em forma de sais ácidos ou bissulfitos. Também ocorrem as formas de ácido sulfuroso não dissociado (H₂SO₃), íon bissulfito, sulfuroso totalmente dissociado (SO₃²⁻) e SO₂ molecular. A forma mais ativa sobre o sistema metabólico da bactéria é o SO₂ gasoso dissolvido (PEYNAUD, 1984).

O princípio de ação da sulfitação se dá pela destruição de proteínas enzimáticas, e o bloqueio das funções se vê potencializado pelo álcool. O pH afeta a dissociação do SO₂, pois valores menores de pH resultam em uma maior proporção de SO₂ molecular (WIBOWO et al., 1985).

Não é somente o SO₂ livre que tem poder antisséptico; as formas combinadas também são ativas. O SO₂ combinado é de 5 a 10 vezes menos ativo que o SO₂ livre, porém é preciso levar em conta que pode ser também de 5 a 10 vezes mais abundante no vinho (PEYNAUD, 1984).

Quando se trata de inibir a fermentação maloláctica, a estabilidade do vinho não é somente a consequência da atividade antibacteriana do dióxido de enxofre livre do mosto, mas também do SO₂ combinado que conserva o vinho depois da vinificação. Uma parte do SO₂ adicionado ao mosto ou ao vinho passa

rapidamente a uma forma ineficaz porque se combina com os grupos carbonila do acetaldeído, piruvato e do α -cetoglutarato. O melhor controle das bactérias lácticas se realiza com adição de SO_2 após a realização da fermentação maloláctica (CAVIN et al., 2000; PEYNAUD, 1984).

2.6.7 – Efeitos de ácidos orgânicos sobre a fermentação maloláctica

Os ácidos orgânicos do vinho originam-se, por um lado, da uva (polpa e película da baga) e por outro, dos fenômenos fermentativos. A natureza e a concentração dos ácidos formados estão relacionadas com as diferentes técnicas de elaboração (CABANIS, 2000).

Os ácidos tartárico e málico representam mais de 90% do total de ácidos orgânicos originados da uva. Outros ácidos como o cítrico, isocítrico, glutárico, fumárico, 2-cetoglutárico e xiquímico estão presentes em pequenas concentrações. No vinho, os ácidos orgânicos são representados, principalmente, pelos ácidos tartárico, láctico, succínico, galacturônico, acético, propiônico e butírico (BOULTON et al., 1996).

A presença dos ácidos orgânicos, como, pirúvico, láctico, succínico, tartárico e fumárico é desfavorável à produção de biomassa e à atividade maloláctica das bactérias. O ácido tartárico e málico tem ação inibidora sobre o crescimento microbiano. O ácido fumárico, ativador em concentrações pequenas, torna-se inibidor em concentração de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ a $1,5 \text{ g L}^{-1}$. Cabe destacar que certas bactérias têm a capacidade de transformar o ácido fumárico em ácido málico por ação da enzima fumarase (CAVIN et al., 2000).

O ácido succínico não é metabolizado pelas bactérias lácticas. O glucanato formado pelos fungos e bactérias acéticas pode ser fermentado pelas bactérias lácticas em ácido láctico, CO_2 e ácido acético. Já o ácido pirúvico é diretamente convertido em ácido láctico. Quando o meio está ácido, a lactato desidrogenase é pouco ativa, o que conduz a utilização da alfa-cetolactato liase, portanto, à formação de diacetil e acetoína. Algumas linhagens de *Lactobacillus* e *Pediococcus* apresentam

ainda a capacidade de transformar o ácido succínico em ácido acético e ácido fórmico via piruvato liase (CAVIN et al., 2000).

Segundo MANFROI (1997), a acidez total no mosto em relação ao vinho é reduzida a aproximadamente à metade, em consequência da precipitação do potássio no tratamento de refrigeração, e também, pela redução do ácido málico durante a fermentação maloláctica. Resultado idêntico foi encontrado por RIZZON et al. (1997), no qual evidenciaram que a fermentação maloláctica causou uma diminuição significativa da acidez total nos vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Isabel.

A principal propriedade dos ácidos orgânicos é a de contribuir em grande parte à acidez do vinho, diferenciando-se entre a acidez total, a volátil e a real definida pelo pH, que representa a concentração de íons hidrogênio que provém da dissociação dos ácidos (CABANIS, 2000).

Comparando três regiões distintas do Estado do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves se caracterizou por apresentar os teores significativamente mais elevados de ácido tartárico no mosto Merlot. As condições climáticas, a natureza do solo, o manejo do dossel vegetativo e a produtividade foram, possivelmente, fatores determinantes nas diferenças de concentração deste ácido orgânico (RIZZON et al., 1998).

2.7 – Influência dos compostos fenólicos na qualidade do vinho

Os constituintes fenólicos possuem uma grande importância em enologia pois atuam direta ou indiretamente na qualidade dos vinhos. São a origem da cor e da adstringência, sendo atribuída a esta última, em particular, a presença dos taninos (CHEYNIER et al., 2000).

A uva contém essencialmente compostos não flavonóides, na polpa da baga, e flavonóides nas camadas que compõem a casca, nas sementes e na ráquis. Desta maneira, o processamento adotado condiciona o grau de extração dos polifenóis a partir das diferentes partes do cacho e das reações destas moléculas, contribuindo assim de maneira essencial à composição polifenólica dos vinhos (CHEYNIER et al., 2000) e são um importante subgrupo, no qual se encontram as

antocianinas, que formam uma classe de pigmentos extensamente distribuídos nas plantas superiores. As antocianinas são pigmentos responsáveis por uma variedade de cores atrativas e brilhantes de frutas, flores e folhas que variam do vermelho-vivo ao violeta e azul (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

As antocianinas são glicosídeos de antocianidinas, cujo núcleo básico é o cátion flavilium. Todas as antocianinas estão compostas por duas ou três partes: a estrutura básica, que é a antocianidina (aglicona), esterificada com um ou mais açúcares, os quais, por sua vez, podem ser acilados com uma ou mais moléculas de ácidos orgânicos (FRANCIS, 1992; USSEGLIO-TOMASSET, 1998).

As antocianinas se caracterizam estruturalmente por possuírem um esqueleto carbônico $C_6-C_3-C_6$, podendo, dessa maneira, associar-se a compostos flavonóides não-antociânicos. Por outro lado, apesar de os flavonóides antociânicos possuírem a mesma origem biossintética de outros flavonóides não-antociânicos, eles se diferenciam por absorverem intensidade luminosa em regiões diferentes do espectro. Os flavonóides antociânicos absorvem fortemente na região espectral visível e apresentam coloração mais forte, enquanto os flavonóides não-antociânicos absorvem na região compreendida entre 350 nm e 380 nm (BROUILLARD, 1982).

As antocianinas e as antocianidinas absorvem intensidade luminosa fortemente na região compreendida entre os comprimentos de onda de 465 nm a 550 nm, por outro lado, ocorre uma absorvância muito menor na região entre 270 nm a 280 nm. A posição dos picos varia em função do pH do meio. A posição e a espécie dos açúcares presentes na molécula têm pouca influência na absorvância das antocianinas (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

As antocianinas são pigmentos relativamente instáveis, sendo mais estáveis em meio ácidos. A degradação das antocianinas não ocorre somente durante a extração dos tecidos das plantas, mas também durante o processamento e a estocagem dos alimentos (VON ELBE & SCHWARTZ, 1996).

Devido à sua natureza altamente reativa, as antocianinas degradam-se facilmente, ou mesmo reagem com outros constituintes do meio, originando formas incolores ou compostos marrons. A presença do íon oxônio adjacente ao carbono 2 faz com que as antocianinas sejam particularmente suscetíveis ao ataque nucleofílico por compostos tais como dióxido de carbono, ácido ascórbico, peróxido de

hidrogênio e água. A perda de pigmentação das antocianinas se deve ainda à presença de oxigênio e de várias enzimas, bem como a altas temperaturas de processamento. Finalmente, o pH tem um efeito marcante sobre a estabilidade e sobre a cor do meio contendo esses pigmentos (JACKMAN et al., 1987).

As soluções de antocianinas apresentam uma coloração vermelha mais intensa, em pH abaixo de 3,0. Quando se eleva o pH para a faixa de 4,0 a 5,0, a coloração vermelha tende a desaparecer. Aumentos adicionais de pH levam as antocianinas a apresentarem uma coloração azulada, os quais, após estocagem ou aquecimento, tornam-se amareladas (MAZZA & BROUILLARD, 1987).

A evolução da cor de vinhos tintos é um fenômeno complexo. Enquanto a cor vermelho-púrpura dos vinhos jovens é devido às antocianinas extraídas no curso da vinificação, a cor de vinhos envelhecidos é usualmente atribuída a pigmentos específicos resultantes de interações entre antocianinas e outros compostos fenólicos, em particular, os flavanóis (CAMEIRA-DOS-SANTOS et al., 1996).

A reação de copigmentação é provavelmente o principal mecanismo de interação molecular envolvido em variações da cor de vinhos envelhecidos e da adstringência durante a produção e o envelhecimento dos vinhos (MAZZA, 1995).

Existem várias substâncias orgânicas que podem atuar como copigmentos, incluindo flavonóides, outros polifenóis, aminoácidos, nucleotídeos, alcalóides e até mesmo as próprias antocianinas (MAZZA, 1995).

A composição antociânica de diferentes cepas de *Vitis vinifera* varia em função do clima, local, solo, manejo da videira e da tecnologia de elaboração do vinho, podendo variar de 500 a 3000 mg kg⁻¹ de bagas (CHEYNIER et al., 2000), e no vinho, varia de 20 a 500 mg L⁻¹ (CHEYNIER & TEISSEDRE, 2000).

Outra classe de compostos fenólicos é os taninos (3-flavanóis), caracterizados pela sua capacidade em combinar-se com as proteínas e outros polímeros como os polissacarídeos. Os taninos associados com as proteínas, funcionam como clarificantes, formando associações insolúveis que provocam a precipitação das partículas suspensas deixando o líquido límpido (USSEGLIO-TOMASSET, 1998).

Os principais 3-flavanóis monômeros da uva são a catequina e seu isômero a epicatequina e a galocatequina. Verificam-se grandes diferenças de

concentração entre as variedades de uvas tintas e brancas, podendo variar de 10 mg kg⁻¹ a 100 mg kg⁻¹ de bagas (CHEYNIER et al., 2000); média de 500 mg kg⁻¹ (BOULTON et al., 1996), e no vinho, pode variar de 64 mg L⁻¹ a 1300 mg L⁻¹ (CHEYNIER & TEISSEDRE, 2000).

2.8 – Influência dos compostos voláteis na qualidade do vinho

As leveduras são capazes de sintetizar todos os aminoácidos a partir do nitrogênio amoniacal. Quando elas têm a disposição nitrogênio amoniacal como única fonte de alimento nitrogenado, produzem baixas concentrações de álcoois superiores, na ordem de 60 mg L⁻¹. Ao contrário, quando as leveduras possuem como única fonte de nitrogênio, os aminoácidos, têm-se uma notável produção de álcoois superiores, que normalmente ultrapassa a concentração de 600 mg L⁻¹. Desta maneira, pode-se afirmar que a produção de álcoois superiores dependem do metabolismo das leveduras (USSEGLIO-TOMASSET, 1998).

Segundo CARRAU et al. (2001), as leveduras *S. cerevisiae* possuem a capacidade de produzir diferentes concentrações de substância aromáticas em função de diferentes fatores, como por exemplo, temperatura de fermentação, cultivar, micronutrientes, vitaminas e composição de nitrogênio assimilável do mosto.

O aroma de vinho é extremamente complexo, o que se deve, em parte, à sua origem, que é o resultado final de uma extensa seqüência biológica, bioquímica e tecnológica levando a um grande número de constituintes voláteis (mais de 500), cujas concentrações vão desde alguns nanogramas a algumas centenas de microgramas por litro. Mesmo compostos sem odor que provêm da uva são suscetíveis de liberar moléculas odoríferas pela influência de diversos fatores biológicos, biotecnológicos e físico-químicos. Assim, durante a apreciação do aroma do vinho e sua evolução deve-se observar o conjunto desses constituintes voláteis (compostos livres) e precursores (compostos ligados) que conjuntamente constituem o potencial aromático do vinho (BAYONOVE et al., 2000).

Os constituintes do aroma do vinho têm sido classificados segundo sua origem e ao longo da sua cadeia biotecnológica de elaboração, distinguindo-se assim (BAYONOVE et al., 2000):

1) constituintes varietais que provém da uva: dependem essencialmente da variedade e também de outros fatores (fitossanitários, climáticos, região, condução da planta). Na maior parte das cultivares para vinificação, geralmente pouco aromáticas, os ácidos graxos, glicosídeos, carotenóides e compostos fenólicos são, essencialmente, os precursores dos compostos voláteis. Como exemplos destes compostos temos as pirazinas (2-metoxi-3-isobutil-pirazina, 2-metoxi-3-S-butil-pirazina, 2-metoxi-3-isopropil-pirazina) e os terpenóis (geraniol, nerol, linalol, citronelol, α -terpineol) (BAYONOVE et al., 2000).

2) constituintes pré-fermentativos: formados durante as etapas que vão desde a colheita até o início da fermentação alcoólica; são essencialmente compostos (álcoois e aldeídos) com 6 átomos de carbono, produzidos por ação de enzimas da uva sobre certos lipídeos (ácidos linoléico e linolênico, hexanol) (CROUZET, 2000).

3) constituintes voláteis do processo fermentativo: formados pela levedura durante a fermentação alcoólica e pelas bactérias lácticas durante a fermentação maloláctica. A levedura tem um papel essencial de produzir álcool a partir de açúcar e os produtos da fermentação gliceropirúvica. Os constituintes fermentativos do aroma são produtos do metabolismo secundário da levedura sendo estes compostos formados os mais abundantes no produto acabado. Como exemplo têm-se álcoois, ácidos e seus ésteres (etanol, acetato de etila, 3-metil-1-butanol, 2-feniletanol, ácido acético, ácido láctico, lactato de etila, ácido succínico, etc.); compostos de carbono (acetaldeído, diacetil, fenilacetaldéido, acetoína); compostos de enxofre (metil mercaptano, 3-metilpropilpropanol, etc.); compostos nitrogenados (2-feniletilamina, N-(2-feniletil)-Acetamida); lactonas (γ -Nonalactona, Δ -Decalactona, etc.); fenóis voláteis (4-Vinilfenol, 4-Vinilguayacol, 4-Etilfenol, etc.) (BAUMES, 2000).

4) constituintes pós-fermentativos: incluem todos os compostos voláteis que se formam durante a conservação do vinho, cuja duração poderá ser de vários anos. São substâncias voláteis originadas por reações físico-químicas e biológicas que se produzem no vinho jovem ou de precursores varietais que se transformam em compostos voláteis. O conjunto destes processos corresponde às transformações do aroma do vinho durante esta fase (BAUMES, 2000). As principais modificações nos compostos voláteis afetam os ésteres, os compostos monoterpênicos e

norisoprenóidicos, os fenóis voláteis, os compostos de enxofre e os derivados de furfural (GÜNATA, 2000).

2.9 - Aminas bioativas em vinhos

Aminas bioativas ou biologicamente ativas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixo peso molecular. Estas substâncias são formadas por processos bioquímicos e participam de funções metabólicas e fisiológicas importantes nos organismos vivos, desempenhando diversas atividades biológicas (LIMA & GLÓRIA, 1999).

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupos amina, da estrutura química e da via biossintética. Quanto a esta última, a mais utilizada, as aminas podem ser classificadas em poliaminas e aminas biogênicas. As poliaminas putrescina, agmatina, espermina e espermidina são formadas *in situ* à medida que são requeridas. As biogênicas são formadas pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas. Fazem parte deste grupo histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina e cadaverina (LIMA & GLÓRIA, 1999).

As poliaminas desempenham um papel importante no metabolismo de plantas, animais e microrganismos. Nos vegetais, estes compostos têm sido associado a inúmeros processos do desenvolvimento da planta. Putrescina, espermina e espermidina, por exemplo, estão envolvidos na síntese de DNA, RNA e proteína, sendo essenciais para a multiplicação e crescimento celular. Além disto, estabilizam a membrana celular e retardam a senescência. Sendo assim, aminas ocorrem naturalmente em vegetais, exercendo funções essenciais ao metabolismo (STARLING, 1998).

Algumas aminas são psicoativas ou vasoativas. As psicoativas, como histamina e serotonina atuam como neurotransmissoras no sistema nervoso central. As vasoativas atuam direta ou indiretamente no sistema vascular, podendo ser vasoconstritoras ou vasodilatadoras. Tiramina, feniletilamina, triptamina e serotonina causam um aumento na pressão sanguínea. A histamina causa vasodilatação (LIMA & GLÓRIA, 1999).

Embora as aminas desempenhem funções fisiológicas importantes, tornam-se um perigo à saúde podendo causar intoxicação se consumidas em grandes quantidades, se as aminoxidases são inibidas por deficiência genética ou por medicamentos inibidores das monoaminoxidases, e se houverem efeitos sinérgicos ou potencializadores. A intoxicação mais freqüente causada por aminas envolve a histamina. Podem ocorrer vários sintomas, dentre eles, cutâneos (urticária, coceira, inflamação localizada e edema), gastrointestinais (náusea, vômito, diarreia, dor abdominal), hemodinâmico (hipotensão) e neurológico (rubor, queimação, dor de cabeça, palpitação, taquicardia). A tiramina é o segundo tipo de amina envolvida em intoxicações alimentares. Em concentração elevada, pode causar dor de cabeça, enxaqueca, febre, vômito, transpiração e aumento da pressão sanguínea. A 2-feniletilamina e a triptamina possuem efeitos similares ao da tiramina. O efeito tóxico de algumas aminas pode ainda ser potencializado pela presença concomitante de outras aminas como putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermidina e espermina. O álcool também é considerado um potencializador dos efeitos tóxicos da histamina e tiramina (LIMA & GLÓRIA, 1999). A putrescina, cadaverina, espermina e espermidina podem reagir com nitrito formando nitrosaminas, que são cancerígenas (FERRANDO, 1986).

Vários estudos têm sido realizados para determinar o conteúdo de aminas em vinho. Os tipos e a concentração de aminas no vinho variam muito. Em geral, os vinhos tintos contêm teores significativamente maiores de aminas do que os brancos. A presença de aminas no vinho está relacionada a inúmeros fatores. Algumas aminas estão normalmente presentes na uva, em teores que variam em função da variedade, do grau de maturação e com o tipo e composição do solo. As aminas encontradas em uvas incluem putrescina e espermidina em maiores proporções e etanolamina, agmatina, cadaverina, espermina e histamina em menores proporções. Outras são formadas e acumuladas durante o processo de fabricação do vinho. Dentre os fatores que afetam a formação de aminas têm-se: o processo de vinificação, a presença de aminoácidos livres, a microbiota presente no vinho durante a fermentação, a duração da fermentação na presença de polpa e casaca, a presença de microrganismos contaminantes, a qualidade e a quantidade de agentes clarificantes, teor alcoólico, concentração de dióxido de enxofre, dentre outros

(ARENA & MANCA DE NADRA, 2001; GLÓRIA et al., 1998; HAJÓS et al., 2000; LIMA & GLÓRIA, 1999; VAZQUEZ-LASA et al., 1998).

Assim sendo, a presença de amins em vinhos pode ser um indicador da qualidade da uva utilizada e das condições higiênico-sanitárias durante a produção. A concentração de amins bioativas em vinhos tem sido investigada em diferentes países. Inclusive, em alguns países limites foram estipulados para histamina em vinhos. A Suécia recomenda 10 mg L^{-1} como teor máximo, a Alemanha 2 mg L^{-1} , a Bélgica 5 mg L^{-1} e a França 8 mg L^{-1} (LIMA & GLÓRIA, 1999).

São poucos os dados disponíveis na literatura quanto aos teores de amins em vinhos brasileiros. A única informação encontrada se refere ao trabalho de SOUZA (2002). Neste estudo, o perfil e teores de amins bioativas foi determinado em 30 amostras de vinho tinto brasileiro das uvas Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e Merlot, produzidas na região de Bento Gonçalves, RS, safra de 1999. O método utilizado foi a cromatografia líquida de alta eficiência por par iônico, derivação pós-coluna com o-ftalaldeído e detecção espectrofluorimétrica. Foram encontradas cinco amins no vinho Merlot, dentre elas, putrescina, histamina, tiramina, serotonina e feniletilamina. Além destas, foi detectada a espermidina nos vinhos Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc. Em todos os tipos de vinho, houve predominância de putrescina, seguido de histamina. Teores totais médios significativamente maiores foram observados em Cabernet Sauvignon ($5,73 \text{ mg L}^{-1}$), seguido de Merlot ($2,77 \text{ mg L}^{-1}$) e Cabernet Franc ($2,52 \text{ mg L}^{-1}$). Concentrações maiores de espermidina, putrescina, histamina, tiramina e feniletilamina foram também detectadas em Cabernet Sauvignon. Teores totais de amins significativamente maiores foram encontrados em Cabernet Sauvignon marcas J e V, em Cabernet Franc P, e em Merlot P. Em nenhuma amostra foram detectadas concentrações de amins capazes de causarem efeitos tóxicos no homem.

No caso da cerveja, utilizando cepas de *S. cerevisiae*: BUIATTI et al. (1995) encontraram triptamina, 2-feniletilamina, putrescina, cadaverina, tiramina e espermidina e não foram detectadas a histamina e espermina; IZQUIERDO-PULIDO et al. (1994), IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996a) e IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996b) encontraram estas mesmas amins; IZQUIERDO-PULIDO et al. (1995), histamina e tiramina; KALAC et al. (1997) encontraram a histamina, tiramina,

triptamina, putrescina e cadaverina; IZQUIERDO-PULIDO et al. (1997) encontraram tiramina em fermentação com *S. cerevisiae* e *Pediococcus* spp.

Ao serem analisados diferentes tipos de vinhos em vários países do mundo: BAUCOM et al. (1986) encontraram histamina e tiramina na França; VIDAL-CAROU et al. (1990a) detectaram histamina e tiramina; VIDAL-CAROU et al. (1990b) histamina e tiramina em vinhos da Espanha; LONVAUD-FUNEL & JOYEUX (1994) detectaram histamina e tiramina na França; MAFRA et al. (1999) determinaram etanolamina, metilamina, etilamina, histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina, isoamilamina e cadaverina em vinhos portugueses; SOLEAS et al. (1999) determinaram no vinho Merlot em Toronto no Canadá, histamina, putrescina, cadaverina, 2-feniletilamina, tiramina, etilamina e metilamina; GERLAND & GERBAUX (1999) encontrou histamina; KANNY & GERBAUX (2000) encontraram histamina, tiramina, putrescina, metilamina, etilamina, feniletilamina, isoamilamina e cadaverina em vinhos de Borgogne; no vinho Merlot PILATTE (1998) comparando as fermentações malolácticas com a flora natural e culturas seleccionadas (*O. oeni*), verificou que na primeira, ocorreu uma maior produção de histamina e putrescina em relação à segunda, e somente a produção de cadaverina foi maior na presença da bactéria pura em relação a flora indígena. Também verificou que não ocorreu produção de tiramina com a flora indígena e com a cultura pura. GLÓRIA et al. (1998) detectaram nos vinhos Pinot Noir e Cabernet Sauvignon em Oregon, concentrações variáveis de várias aminas, dentre elas, histamina, tiramina, triptamina, 2-feniletilamina, serotonina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, no setor de Microvinificação.

A uva utilizada na microvinificação foi da cultivar Merlot, vinificada no ponto de colheita, na safra vitícola 2001.

3.1. – Elaboração do vinho

Foram processados 16 kg de uva para cada repetição (3 repetições) dentro de cada tratamento (12 tratamentos), separada da rãquis e esmagada. A uva esmagada foi colocada em recipientes de vidro com capacidade de 20 L, acrescentando-se dióxido de enxofre ($50,0 \text{ mg L}^{-1}$), leveduras e bactérias liofilizadas, de acordo com os tratamentos propostos. As leveduras e bactérias utilizadas foram as seguintes: *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces cerevisiae* e as bactérias *Oenococcus oeni* DSM 7008, *Oenococcus oeni* DSM 12923 e *Lactobacillus plantarum* DSM 4361, conjugados em diferentes tratamentos apresentados no *Tabela 2*.

As leveduras foram adicionadas imediatamente após a transferência do mosto para os recipientes de vidro, na dose de $250,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de uva. Apenas nos tratamentos T4, T8 e T12, onde foi utilizado *Lactobacillus plantarum* DSM 4361, a adição foi feita duas horas após a adição das leveduras, na dose de $200,0 \text{ mg L}^{-1}$. Em seguida os recipientes foram fechados com válvulas de Müller para impedir o contato do ar com o mosto em fermentação e colocados em sala com temperatura controlada (25°C).

Durante a maceração foi realizada uma remontagem diária. Após seis dias de maceração, fez-se a descuba, com prensagem do bagaço, para permitir que o restante da fermentação se realizasse apenas com a fase líquida. O vinho, após a

descuba, foi colocado em dois garrafões de 5 L. Depois de 15 dias, fez-se uma trasfega, separando a borra do líquido, colocando o vinho em garrafões de 5 L e 3 L. Nesse momento, foram adicionadas as bactérias na dose de 6,0 mg L⁻¹, de acordo com os tratamentos propostos (*Tabela 2*), para a realização da fermentação maloláctica. Após a descuba, o vinho permaneceu em temperatura ambiente.

TABELA 2. Tratamentos empregados na elaboração do vinho Merlot.

Tratamento	Levedura	Bactéria
T1	Leveduras naturais	Bactérias naturais
T2	Leveduras naturais	<i>O. oeni</i> DSM 7008
T3	Leveduras naturais	<i>O. oeni</i> DSM 12923
T4	Leveduras naturais	<i>L. plantarum</i> DSM 4361
T5	<i>S. bayanus</i>	Bactérias naturais
T6	<i>S. bayanus</i>	<i>O. oeni</i> DSM 7008
T7	<i>S. bayanus</i>	<i>O. oeni</i> DSM 12923
T8	<i>S. bayanus</i>	<i>L. plantarum</i> DSM 4361
T9	<i>S. cerevisiae</i>	Bactérias naturais
T10	<i>S. cerevisiae</i>	<i>O. oeni</i> DSM 7008
T11	<i>S. cerevisiae</i>	<i>O. oeni</i> DSM 12923
T12	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. plantarum</i> DSM 4361

Os tratamentos T1 a T12 foram aplicados em três repetições.

O término da fermentação maloláctica foi verificado por meio de cromatografia de papel. Após seis dias, foi realizada mais uma trasfega, separando as borras do líquido, colocando o vinho em garrafões de 5 L e 2 L, transferindo-os para a câmara fria (temperatura de 0°C) por um período de 15 dias para provocar a precipitação do ácido tartárico. Ao término dos 15 dias, o vinho foi envasado em garrafas com capacidade de 750 mL e armazenado horizontalmente sobre estrados de madeira, em sala com temperatura controlada de aproximadamente 18°C. O vinho permaneceu dessa maneira até o início das análises laboratoriais, estas amostras representam os tratamentos já apresentados no *Tabela 2*.

Todos os resultados apresentados, do acompanhamento das fermentações e da composição do vinho acabado, são médias de três repetições analíticas.

3.2. – Métodos analíticos

As análises do mosto e vinho foram realizadas nos Laboratórios de Enoquímica e Instrumentação da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.

A análise das variáveis durante as fermentações alcoólica e maloláctica foram realizadas logo após a retirada das amostras do meio fermentativo. As etapas de coleta foram: mosto (0 dia), descuba (6 dias), fim da fermentação alcoólica (15 dias), início da fermentação maloláctica (22 dias), durante a fermentação maloláctica (40 dias), após a estabilização tartárica (61 dias). As análises do vinho foram realizadas 50 dias após a estabilização tartárica.

As metodologias utilizadas são descritas a seguir.

3.2.1. Densidade

A densidade relativa 20/20°C, foi efetuada através de um densímetro digital ANTON PAAR, modelo DMA 45 (OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1990).

3.2.2. pH

O pH foi determinado através de um potenciômetro digital, marca CORNING, modelo 125, com calibração na faixa de pH entre 3,0 e 4,0 (OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1990).

3.2.3. Grau alcoólico

A determinação do teor alcoólico foi efetuada com um refratômetro de imersão Zeiss, equipado com um prisma número 1 (MEYER & LEYGUE-ALBA, 1991).

O álcool foi determinado pela fórmula:

$$\text{Álcool (°GL)} = \frac{[2.557,19 - (2.585,7 \times D) + (2,6186 \times IR)]}{P}$$

no qual:

D = densidade a 20/20°C;

IR = Índice de refração;

P = peso do álcool (7,892)

3.2.4. Acidez total

A acidez total foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N, utilizando 5 mL de vinho ou mosto, acrescido de 20 mL de água destilada. O indicador usado foi o azul de bromotimol, com viragem em pH 7,6 (OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1990).

O resultado, em meq L⁻¹, foi expresso pela fórmula:

$$\text{Acidez total (meq L}^{-1}\text{)} = \frac{v \times N \times 1000}{V}$$

no qual:

v = volume de NaOH utilizado na titulação;

N = normalidade da solução alcalina, no caso, NaOH 0,1 N;

V = volume de mosto ou de vinho utilizado.

3.2.5. Acidez volátil

A acidez volátil foi determinada através do arraste de vapor com um destilador eletrônico enoquímico, marca Gibertini. Colocou-se no balão de destilação 10 mL da amostra, recolhendo-se 100 mL de destilado. Este método consta da titulação dos 100 mL do destilado, com NaOH 0,1 N, usando a fenolftaleína como indicador, cuja viragem ocorre entre pH 8,2 e 10,0. O resultado, em meq L⁻¹, foi obtido pela fórmula (OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1990):

$$\text{Acidez volátil (meq L}^{-1}\text{)} = \frac{v \times N \times 1000}{V}$$

no qual:

v = volume de NaOH utilizado na titulação;

N = normalidade da solução alcalina, NaOH 0,1 N;

V = volume da amostra de mosto ou de vinho utilizado.

3.2.6. Acidez fixa

A acidez fixa, expressa em meq L⁻¹, foi calculada subtraindo a acidez volátil da acidez total.

3.2.7. Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados através da metodologia proposta por MEYER & LEYGUE-ALBA (1991). Utilizaram-se 20 mL da solução diluída de vinho (50%) em um erlenmeyer, acrescidos de 10 mL de solução de Fehling A e de 10 mL de solução de Fehling B. Ferveu-se por 2 min e imediatamente resfriou-se em banho de gelo. Após, acrescentou-se 3 mL de KI, 10 mL de H₂SO₄ 17% e 2 mL de amido, titulou-se com Na₂S₂O₃.5H₂O 0,1 N.

O volume gasto na titulação foi subtraído do fator de correção do Na₂S₂O₃.5H₂O, que é 26,2. O valor obtido foi submetido a uma tabela específica, que apresenta o resultado de açúcares redutores totais em g L⁻¹.

3.2.8. Dióxido de enxofre livre

O dióxido de enxofre livre foi determinado colocando-se 50 mL de vinho em um erlenmeyer, adicionando-se 2 mL de H₂SO₄ (2:1) e 2 mL de amido 1%, como indicador. A seguir, titulou-se com I₂ 0,02 N até viragem. O ponto de equivalência foi detectado quando a amostra adquiriu tonalidade esverdeada. O cálculo para obtenção desta variável é o seguinte:

$$\text{Dióxido Enxofre Livre (mg L}^{-1}\text{)} = \text{mL gastos I}_2 \text{ 0,02 N} \times 12,8$$

3.2.9. Dióxido de enxofre total

O dióxido de enxofre total foi obtido a partir de uma amostra de 50 mL de vinho, à qual, acrescentou-se 25 mL de KOH 1 N, deixando-se em repouso por 15 min. A seguir foram adicionados 15 mL de H₂SO₄ 1:4 e 2 mL de amido 1%, titulando-se com I₂ 0,02 N. O valor final foi expresso utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Dióxido Enxofre Total (mg L}^{-1}\text{)} = \text{mL gastos I}_2 \text{ 0,02 N} \times 12,8$$

3.2.10. Polifenóis totais

Os polifenóis totais foram determinados diretamente no vinho, pelo Índice 280. A amostra foi diluída 100 vezes, medindo-se a absorvância através de espectrofotômetro, UV/VIS em comprimento de onda de 280 nm (PARONETTO, 1977).

3.2.11. Extrato seco

O método consistiu em colocar as cápsulas de inox em uma estufa, previamente pesadas e dessecadas. A seguir, adicionou-se 25 mL da amostra na cápsula, levando-se à banho-maria por 3 h, ao final das quais, a cápsula foi retirada e acondicionada no dessecador, para posterior pesagem (OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1990). Pelo valor do resultado tem-se:

$$\text{Extrato Seco (g L}^{-1}\text{)} = (b - a) \times \text{FA}$$

onde:

a = peso da cápsula;

b = peso da cápsula + extrato;

FA = fator de ajuste, igual a 40, para expressar a concentração em g L⁻¹.

3.2.12. Extrato seco reduzido

O extrato seco reduzido (g L⁻¹) foi obtido subtraindo do extrato seco, os açúcares redutores (OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1990).

3.2.13. Relação álcool em peso/extrato seco reduzido

Segundo OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (1990), o resultado foi obtido através da seguinte relação:

$$\text{Relação Álcool/Extrato Seco Reduzido} = \frac{\text{Álcool (\%)} \times 8}{\text{Extrato Seco Reduzido}}$$

3.2.14. Cinzas

As cinzas foram determinadas pela incineração em mufla, em cadinhos de platina à 530°C - 550°C, de 20 mL de vinho (OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1990). O cálculo para determinação das cinzas é o seguinte:

$$\text{Cinzas (g L}^{-1}\text{)} = (a - b) \times \text{FA}$$

onde:

a = peso da cápsula com as cinzas;

b = peso da cápsula (cadinho);

FA = fator de ajuste, igual a 50, para expressar a concentração em g L⁻¹.

3.2.15. Alcalinidade das cinzas

Adicionou-se às cinzas já pesadas na cápsula, 10 mL de H₂SO₄ 0,1 N, aquecendo-se durante 1 min em banho-maria. A seguir, titulou-se com NaOH 0,1 N em presença de metilorange 0,2% (USSEGLIO-TOMASSET, 1998). O valor da alcalinidade das cinzas é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Alcalinidade das Cinzas (meq L}^{-1}\text{)} = (10 - \text{mL gastos NaOH}) \times (0,276/0,069)$$

3.2.16. Antocianinas

As antocianinas foram determinadas segundo metodologia proposta por PARONETTO (1977), baseada na propriedade que esses pigmentos possuem de mudar de coloração conforme o pH do meio.

Em dois tubos de ensaio foi colocado 1 mL de amostra de vinho e 1 mL de etanol, 0,1% HCl. Em um dos tubos foram adicionados 10 mL de solução HCl 2% e, no outro, 10 mL da solução tampão com pH 3,5, agitando-se para homogeneização da amostra. Após, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro à 520 nm, com cubeta de 1 cm de espessura. Por diferença de absorbância, calculou-se a concentração de antocianinas, através da fórmula:

$$\text{Antocianinas (mg L}^{-1}\text{)} = (a - b) \times K$$

onde:

a = absorvância do tubo com HCl 2%;

b = absorvância do tubo com tampão;

K = constante obtida por padrões, igual a 388.

3.2.17. Taninos totais

A determinação de taninos totais foi pelo método proposto por PARONETTO (1977).

A amostra de vinho foi diluída com água destilada (2:100; v/v). Colocou-se, em dois tubos de ensaio, 4 mL do vinho diluído, 2 mL de água destilada e 6 mL de HCl concentrado. Um dos tubos foi aquecido em banho-maria durante 30 min e, o outro, foi deixado à temperatura ambiente. No tubo em banho-maria foi acoplado um dispositivo de vidro com gelo, que impedia a perda de vapor. Após o resfriamento, adicionou-se aos tubos 1 mL de etanol para auxiliar na leitura, fazendo a leitura num espectrofotômetro, no comprimento de onda de 550 nm. Para obter o valor final, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Taninos (g L}^{-1}\text{)} = (a - b) \times K$$

onde:

a = absorvância do tubo aquecido;

b = absorvância do tubo ao ambiente;

K = constante obtida por padrões, igual a 19,33.

3.2.18. Índices 420, 520, 620

Efetou-se a avaliação destas variáveis com espectrofotômetro PERKIN-ELMER, modelo LAMBDA 3, realizando-se leituras de absorvância em 420 nm (I420), em 520 nm (I520) e em 620 nm (I620), com cubetas de quartzo de 1 mm de espessura (PARONETTO, 1977).

3.2.19. Nitrogênio total (Método de Kjeldahl)

Utilizou-se um bloco digestor, com controle de temperatura, e um destilador, ambos da marca TECNAL. Primeiramente, a amostra de 2 mL de mosto ou vinho foi submetida a digestão à quente, com adição de 4 mL de H₂SO₄ concentrado e dióxido de selênio. Após a digestão, foi realizada uma destilação visando provocar a liberação de amônia, a qual se combina com ácido bórico, formando borato de amônia. A seguir, procedeu-se à titulação com H₂SO₄ 0,05 N usando como indicador a fenolftaleína. A fração de nitrogênio total foi determinada pela fórmula:

$$N \text{ total (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{N \text{ H}_2\text{SO}_4 \times \text{volume gasto (mL)} \times 350}{\text{volume da amostra (mL)}}$$

3.2.20. Ácidos láctico, málico e tartárico

Os ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo método descrito por AUGUSTE (1979). Utilizou-se um cromatógrafo líquido, marca PERKIN ELMER, Série 200 LC Pump, equipado com bomba isocrática, um detector Arranjo de diodos 235C, e um injetor Rheodyne 7725 com "loop" de 20 µL. A separação dos ácidos orgânicos foi realizada em uma coluna VARIAN MCH-NCAP-5 de 4,6 mm x 15 cm. O detector foi ajustado em um comprimento de onda de 212 nm. Na eluição utilizou-se uma fase móvel constituída de água ultrapura, acidificada com ácido fosfórico a pH 2,5. Para o cálculo da concentração, utilizou-se o método de padrão externo. Quantidades conhecidas dos padrões dos ácidos orgânicos foram dissolvidas em solução com água ultrapura e injetadas no cromatógrafo. As amostras de mosto e vinho foram diluídas a 10% com água ultrapura e injetadas no cromatógrafo. Os resultados foram calculados através do programa MODEL 1022 no equipamento da PE NELSON.

As especificações da coluna e as condições analíticas do aparelho aparecem no *Tabela 3*.

TABELA 3. Condições operacionais utilizadas na determinação de ácidos orgânicos, em mostos e vinhos, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

COLUNA

- Marca: VARIAN MCH-NCAP-5
- Comprimento: 150 mm
- Diâmetro interno: 4 mm
- Diâmetro das partículas: 5 μm

CONDIÇÕES ANALÍTICAS

- Fase móvel: solução: água - ácido fosfórico (pH 2,5) - (98,8:1,2; v/v), com vazão de 0,9 mL min⁻¹
- Temperatura: ambiente
- Pressão: 100 atm
- Volume injetado: 20 μl
- Detector: UV - 212 nm
- Sensibilidade: 0,5 D.O.

REGISTRADOR

- Fundo de escala: 1 mV
 - Velocidade do papel: 6 cm min⁻¹
-

3.2.21. Compostos voláteis

Os compostos voláteis acetato de etila, metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e a soma dos álcoois superiores do vinho Merlot foram determinados através de um cromatógrafo à gás, marca CG Instrumentos Científicos, modelo 3537-S, com detector de ionização de chama (BERTRAND, 1975). As características da coluna e os parâmetros de operação do aparelho estão no *Tabela 4*.

Foram preparados padrões dos compostos a serem analisados e do padrão interno (4-metil-2-pentanol a 1 g L^{-1}), que foram injetados no aparelho. As amostras foram preparadas colocando-se 20 mL do vinho, em presença de 2 mL do padrão interno num erlenmeyer com tampa rosqueável. Esta amostra foi agitada durante 5 min e, após, foi injetada no cromatógrafo.

A concentração dos compostos voláteis foi calculada pela seguinte fórmula:

$$C \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = c \times \frac{h \times I}{H \times i}$$

onde:

C = concentração da substância desejada;

c = concentração da substância na solução padrão de referência;

h = altura do pico da substância do vinho;

H = altura do pico da substância na solução padrão de referência;

I = altura do pico do padrão interno na solução padrão de referência;

i = altura do pico do padrão interno da substância no vinho.

TABELA 4. Condições operacionais utilizadas na determinação de compostos voláteis no vinho, empregando cromatografia gasosa (CG).

COLUNA

- Tipo: 5% Carbowax 400 + 2% Hallcomid M 18 OL
- Comprimento: 4,5 m
- Diâmetro: 3,175 mm
- Material: vidro

CONDIÇÕES ANALÍTICAS

- Temperatura da coluna: 72°C
- Temperatura do vaporizador: 150°C
- Temperatura do detector: 190°C
- Vazão do gás de arraste: N = 30 mL min⁻¹
O = 300 mL min⁻¹
H = 25 mL min⁻¹
- Volume da amostra injetada: 3 µl

REGISTRADOR

- Fundo de escala: 1 mV
 - Velocidade do papel: 40 cm h⁻¹
-

3.2.22. Aminas bioativas

As aminas biogênicas foram determinadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

1. Material

Padrões de aminas bioativas

Todas as aminas utilizadas como padrão foram adquiridas da Sigma (Saint Louis, MO, EUA). A solução padrão das aminas bioativas foi preparada conforme descrito a seguir. Para as soluções-estoque I pesou-se 18,3 mg de dihidrocloreto de putrescina; 17,1 mg de dihidrocloreto de cadaverina; 16,6 mg de dihidrocloreto de histamina; 10,0 mg de tiramina; 22,0 mg de 5-hidroxitriptamina complexado com sulfato de creatinina monohidratado (serotonina); 17,6 mg de sulfato de agmatina; 17,5 mg de trihidrocloreto de espermidina; 13,0 mg de dihidrocloreto de 2-feniletilamina; 17,2 mg de tetrahidrocloreto de espermina e 10,0 mg de triptamina. Estas substâncias foram dissolvidas, separadamente, em 10 mL de ácido clorídrico 0,1 N, preparado com água grau cromatografia líquida, de forma a se obter concentração de 1 mg mL⁻¹ de cada amina.

A solução-estoque II foi preparada a partir das soluções-estoque I, transferindo-se alíquotas de 1 mL de cada solução de amina para um balão volumétrico de 10 mL, formando um "pool" contendo 100 µg mL⁻¹ de cada amina.

A solução-estoque III foi preparada retirando-se 1 mL da solução-estoque II e diluindo-a para 10 mL com ácido clorídrico 0,1 N obtendo-se uma concentração de 10 µg mL⁻¹ de cada amina. As soluções-trabalho foram preparadas a partir da solução-estoque III, retirando-se alíquotas contendo 0,5 mL, 4,0 mL e 7,0 mL e completando o volume para 10 mL de forma a se obter soluções-padrão de 0,5 µg mL⁻¹, 4,0 µg mL⁻¹ e 7,0 µg mL⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas a 4°C. A estabilidade destas soluções foi monitorada e, quando necessário, novas soluções foram preparadas.

2. Metodologia analítica para determinação de aminas bioativas

As aminas bioativas foram separadas utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência por pareamento de íons e quantificadas espectrofluorimetricamente após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (OPA), segundo metodologia descrita por VALE & GLÓRIA (1997).

As amostras foram degaseificadas em aparelho ultra-som, filtradas em membranas HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro e injetados no cromatógrafo líquido. Cada amostra foi analisada em duplicata.

O sistema de cromatografia líquida utilizado consistiu no equipamento Shimadzu® (Kioto, Japão), modelo LC-10 AD com câmara de mistura à baixa pressão; conjunto de lavagem automática de pistão; injetor automático modelo LC-10 AD; detector espectrofluorimétrico modelo RF-551 a 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente; e uma unidade de controle CBM 10AD conectado a microcomputador Pentium à temperatura controlada ($21,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$).

Foram usadas coluna de fase reversa (3,9 x 300 mm, 10 µm) e pré-coluna µBondapak C₁₈ (Waters, Milford, MA, EUA) e sistema gradiente de eluição. As fases móveis empregadas foram: A – solução tampão acetato de sódio a 0,2 M e ácido 1-octanosulfonato de sódio a 10 mM, pH ajustado para 5,0 com ácido acético e B – acetonitrila a um fluxo de 0,8 mL min⁻¹. As fases móveis foram filtradas em membranas (47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro) tipo HAWP para solvente aquoso e HVWP para solvente orgânico (Millipore Corp, Milford, MA, EUA). O gradiente utilizado foi em tempo (min)/% B: 13/11; 19/30; 24/11; 45/11.

Um sistema de derivação pós-coluna foi montado utilizando-se uma câmara de mistura (volume morto igual a zero), instalada entre a saída da coluna e o detector. Um tubo de teflon (sob o abrigo da luz) de 2 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro foi conectado entre a câmara de mistura e o detector. Uma bomba LC-10 AD (Shimadzu®, Kioto, Japão) bombeou a solução derivante à câmara de mistura a um fluxo de 0,4 mL min⁻¹ (GLÓRIA et al., 1998).

A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água grau cromatografia, pH ajustado para 10,5 com hidróxido de potássio. Foi adicionado a essa solução 1,5 mL de Brij-35, 1,5 mL de mercaptoetanol e 0,2 g de *o*-ftalaldeído (OPA).

A identificação das aminas foi baseada na comparação dos tempos de retenção das aminas encontradas nas amostras com os tempos das aminas na solução padrão de trabalho. A confirmação das mesmas foi feita pela adição de quantidade conhecida da solução-padrão da amina suspeita na amostra. A quantificação das aminas foi feita utilizando-se as equações das respectivas curvas-padrão conforme indicado na *Tabela 5*. Os limites de quantificação foram determinados e estão indicados na mesma tabela.

O cálculo da concentração das aminas foi realizado utilizando-se a área do pico obtido no cromatograma.

TABELA 5. Equação da reta e coeficiente de correlação da regressão linear das curvas padrão limite de quantificação de cada amina bioativa.

Aminas bioativas	Curva Padrão ¹		Limite de quantificação (mg L ⁻¹)
	Equação da reta	R ²	
Espermidina	Y = 188750X + 24983	0,998	0,40
Espermina	Y = 105956X + 34511	0,995	0,40
Agmatina	Y = 158549X + 18397	0,998	0,80
Putrescina	Y = 398444X - 38161	0,998	0,40
Cadaverina	Y = 399508X + 30716	0,998	0,40
Histamina	Y = 206823X + 18297	0,997	0,40
Tiramina	Y = 154797X - 29613	0,999	0,40
Serotonina	Y = 86096X + 18720	0,993	0,80
2-feniletilamina	Y = 223190X + 40708	0,996	0,40
Triptamina	Y = 131653X + 38436	0,994	0,80

¹Y = área; x = concentração; R² = coeficiente de correlação

3.3. – Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial de Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, por 7 degustadores treinados. Foram realizadas três sessões, onde foram degustados, às cegas, quatro tratamentos com

três repetições por dia, totalizando doze vinhos. A ficha utilizada para a análise sensorial encontra-se no *Apêndice 1*.

3.4. – Análise estatística

Os resultados obtidos para as variáveis das fermentações alcoólica e maloláctica do vinho e análise sensorial foram analisados estatisticamente, utilizando pacote estatístico SAEG 5.0, da Central de Processamento de Dados da UFV. O esquema estatístico do experimento foi em parcelas subdivididas num delineamento inteiramente casualizado. Para os dados quantitativos foram utilizadas análises de regressão quando F significativo. Para o teste de médias foi utilizado o teste de Tukey a 1% de probabilidade.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das figuras de 1 a 8 foram representadas por meio de análise de regressão. As equações representam o ajuste do modelo de regressão aos dados de concentração da referida substância em relação ao tempo. As respectivas equações de regressão são apresentadas no *Apêndice 2*.

4.1. Evolução da fermentação alcoólica e maloláctica

4.1.1. Densidade

A densidade do mosto da uva tem relação direta com a concentração de açúcares e no vinho, com o teor alcoólico e os açúcares redutores. Observou-se que ocorreu um decréscimo na densidade representado por um modelo raiz quadrada em todos os tratamentos durante a etapa de processamento, que vai do desengace e o esmagamento da uva até a elaboração do vinho. A densidade diminuiu rapidamente nos primeiros 6 dias do início da fermentação alcoólica, em consequência da transformação bioquímica do açúcar em álcool (*Figura 1*).

A partir do dia 6 até o dia 15, quando do término da fermentação alcoólica, a densidade foi diminuindo lentamente, estabilizando-se com o final da fermentação maloláctica. O decréscimo acentuado da densidade, observado na fase inicial da fermentação alcoólica representa o elevado consumo de açúcares e outros compostos de alta densidade e consequente formação de etanol e CO₂, atenuando o mosto. Nas etapas subseqüentes a atenuação do mosto é mais lenta, sendo esta caracterizada por transformações referentes à maturação *in vitro* do vinho, onde ocorre alterações bioquímicas e microbiológicas mais importantes de sabor, aroma, estabilidade e cor do vinho.

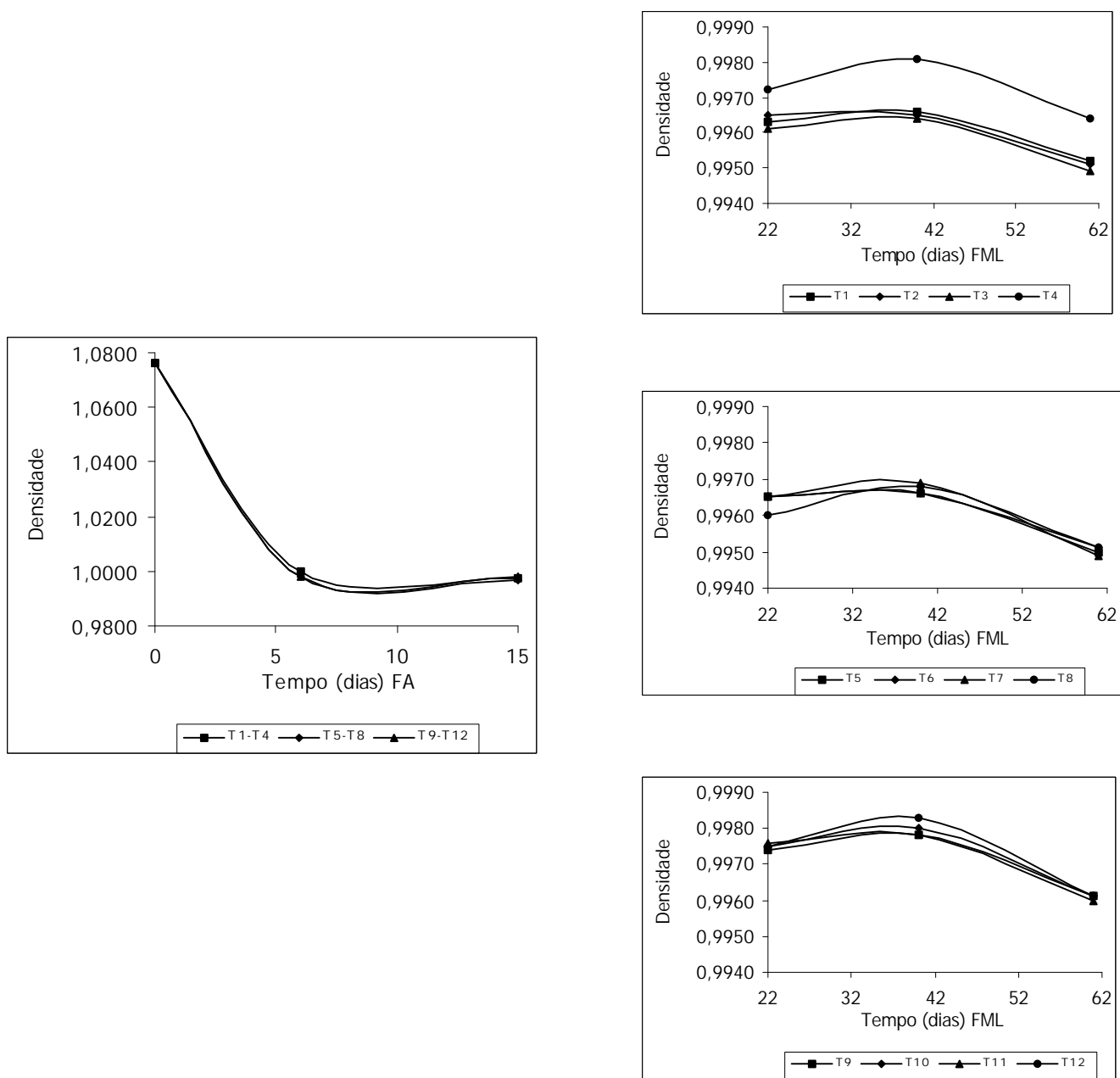


FIGURA 1. Comportamento da densidade durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001. Fermentação alcoólica: T1–T4: leveduras naturais; T5–T8: *Saccharomyces bayanus*; T9–T12: *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação maloláctica: T1–T5–T9: bactérias naturais; T2–T6–T10: *Oenococcus oeni* DSM 7008; T3–T7–T11: *Oenococcus oeni* DSM 12923; T4–T8–T12: *Lactobacillus plantarum* DSM 4361.

A fermentação alcoólica foi realizada por leveduras naturais, *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces cerevisiae*, por isso a figura foi representada por três retas, ao passo que cada reta deu origem a outras quatro retas na fermentação maloláctica, pois foi realizada por bactérias naturais, *Oenococcus oeni* DSM 7008, *Oenococcus oeni* DSM 12923 e *Lactobacillus plantarum* DSM 4361.

Pode-se observar pela densidade que em todos os tratamentos a metabolização dos açúcares durante a fermentação alcoólica foi realizada normalmente, com resultados idênticos, mesmo naqueles tratamentos onde foram adicionadas as bactérias juntamente com as leveduras. Ao observar a *Tabela 6*, percebe-se que a densidade final diferiu significativamente ($P < 0,01$) entre os tratamentos, sendo que os tratamentos com *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram maior densidade e, portanto, menor atenuação. Esta menor densidade não foi acompanhada proporcionalmente pelo teor alcoólico no vinho, tendo o produto acabado valores entre 9,7% a 10,3% de álcool v/v a 20 °C.

As condições de produção de vinho utilizadas neste experimento foram semelhantes às aquelas empreendidas em pequenas vinícolas. Os vinhos resultantes de microvinificações, normalmente não sofrem uma influência significativa de fatores adversos como temperatura e contaminações por microrganismos indesejáveis, pois, trabalha-se com pequenos volumes, adicionando-se leveduras selecionadas e antissépticos adequados ao processamento, esperando-se portanto, densidades semelhantes nos diferentes tratamentos.

O único tratamento que diferenciou dos demais na fermentação maloláctica foi o tratamento T4 (*Figura 1*) pois, nesse tratamento foi adicionado *Lactobacillus plantarum* no início da fermentação alcoólica. Possivelmente, esse resultado pode ter sido influenciado pela concentração de células da bactéria no meio fermentativo após a realização da fermentação alcoólica. Esse fato pode demonstrar que as bactérias presentes no meio desde o início da fermentação alcoólica, possivelmente, têm uma melhor adaptação ao meio para em seguida iniciar a fermentação maloláctica de forma mais ativa.

O término das fermentações alcoólicas foi semelhante, sendo concluídas em aproximadamente 15 dias. PRIETO et al. (2001), conduzindo fermentações em diferentes tratamentos utilizando leveduras e bactérias, também observaram que o tempo médio de duração não diferenciou significativamente em função da adição de diferentes espécies microbianas.

4.1.2. pH

O pH do vinho depende do tipo e da concentração dos ácidos orgânicos e da concentração de cátions, especialmente potássio. Os ácidos orgânicos exercem influência sobre o pH do mosto, representando 90% dos ácidos constituintes da uva. No presente trabalho, o pH do mosto imediatamente após o esmagamento foi de 3,24, valores representados pelos modelos de regressão quadráticos e cúbicos. No decorrer da fermentação alcoólica o pH foi aumentando lentamente até o 22º dia, quando se iniciou a fermentação maloláctica. Esta segunda fermentação ocasionou outro aumento de pH até o 40º dia, diminuindo posteriormente até o final da fermentação maloláctica. O pH do vinho após o término da fermentação maloláctica, normalmente é maior que o pH do mosto no início da fermentação alcoólica (*Figura 2*).

No presente estudo, as duas etapas da vinificação onde ocorreu aumento nos valores de pH foram na descuba e na fermentação maloláctica. Comportamento semelhante foi observado por RIZZON & MIELE (2002), constatando-se que o aumento do pH foi mais evidente entre o esmagamento da uva e a descuba do mosto.

O pH dos vinhos, cujos tratamentos utilizaram *S. cerevisiae*, foram menores em relação aos demais (T9 a T12). Nos tratamentos onde *L. plantarum* (T4, T8 e T12) foi adicionado juntamente com a levedura, o pH foi maior no início da fermentação maloláctica, indicando uma possível degradação do ácido málico durante a fermentação alcoólica e menor ao final da maloláctica pois, a acidez total do vinho nestes tratamentos foram menores quando comparados com os tratamentos dentro do seu grupo.

No trabalho realizado por RIZZON et al. (1997) e RIZZON et al. (1998), constatou-se que a fermentação maloláctica provoca um aumento significativo nos valores de pH nos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot.

A acidez real dos mostos pode variar de pH 2,8 a 3,8, segundo as regiões vitícolas e condições de maturação. Para esse intervalo de acidez, as leveduras responsáveis pela transformação dos açúcares em álcool se desenvolvem

normalmente, mesmo que para a maioria o desenvolvimento máximo se situe em pH superior (CABANIS, 2000).

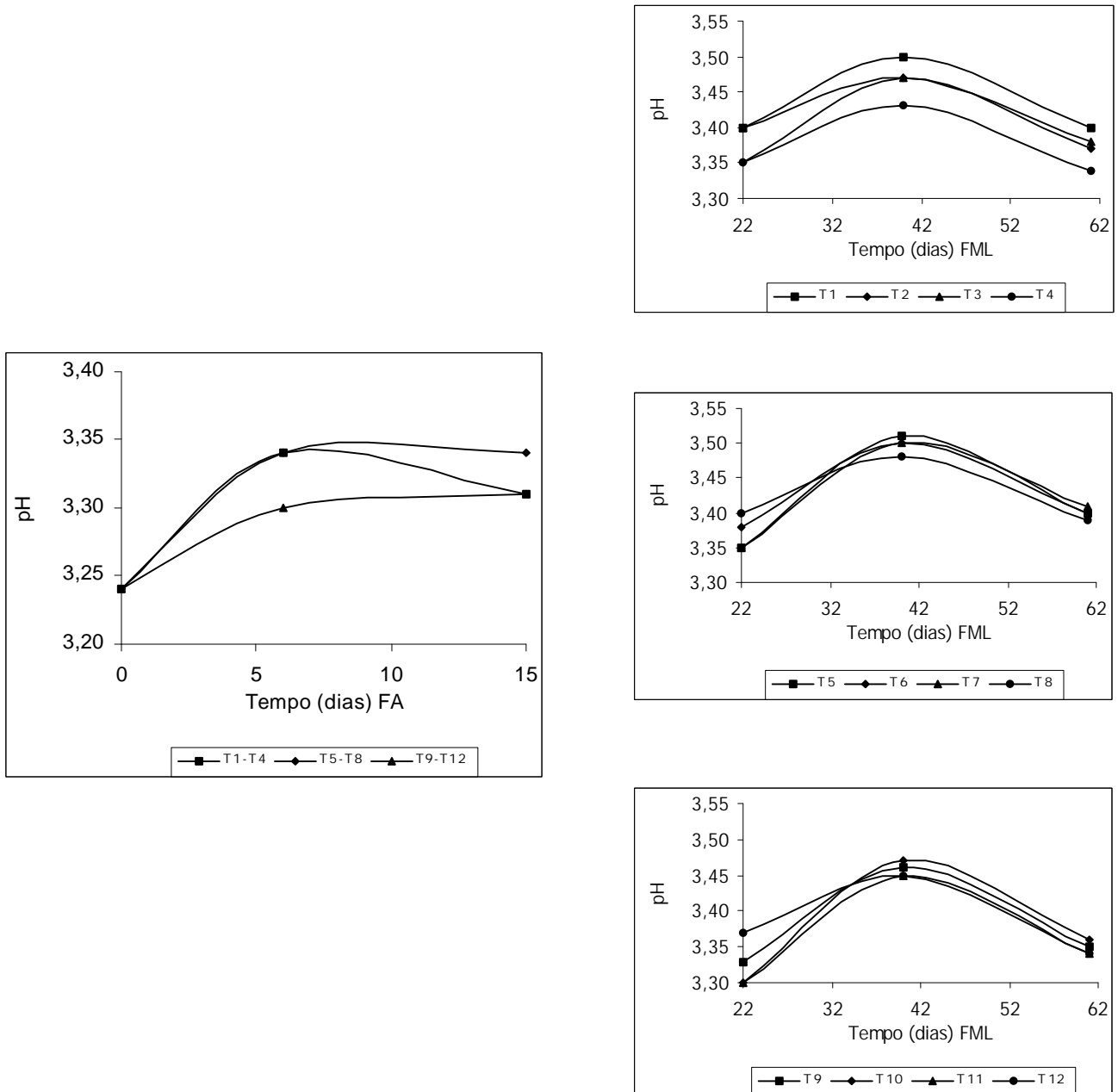


FIGURA 2. Comportamento do pH durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) uva Merlot na safra 2001. Fermentação alcoólica: T1-T4: leveduras naturais; T5-T8: *Saccharomyces bayanus*; T9-T12: *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação maloláctica: T1-T5-T9: bactérias naturais; T2-T6-T10: *Oenococcus oeni* DSM 7008; T3-T7-T11: *Oenococcus oeni* DSM 12923; T4-T8-T12: *Lactobacillus plantarum* DSM 4361.

4.1.3. Acidez total

A acidez total no mosto em relação ao vinho diminuiu em todos os tratamentos, valores representados pelos modelos de regressão raiz quadrada, quadrático, cúbico e linear. Pode-se observar que os tratamentos que utilizaram *S. cerevisiae*, os valores de acidez total foram superiores aos demais durante a fermentação alcoólica. Segundo RANKINE (2000), durante a fermentação alcoólica ocorre a formação de ácidos orgânicos (succínico, láctico e outros) e o ácido málico pode desaparecer devido à ação bacteriana durante a fermentação maloláctica. A produção desses compostos pode influenciar na permanência da acidez total alta. A acidez na uva e no mosto consiste principalmente nos ácidos tartárico e málico, que juntos, representam mais de 90% da acidez total. Também ficou evidenciado que o tratamento T4, após o 22º dia, continuou com a acidez maior em relação aos outros tratamentos (*Figura 3*).

No presente trabalho a diminuição da acidez do mosto em relação ao vinho não foi tão acentuada, reduzindo, aproximadamente, 30%. Resultados semelhantes foram apresentados por MANFROI (1997) e RIZZON et al. (1997).

Entre os constituintes do vinho, aqueles relacionados à acidez são os que mais sofrem a interferência dos fatores naturais, como clima e minerais do solo, principalmente potássio. O aumento da concentração deste nos vinhos determina o aumento do pH e a redução da acidez total. A acidez condiciona a estabilidade biológica, a cor e as características gustativas dos vinhos (RIZZON et al., 1998).

RIZZON et al. (1998), constataram que a partir do esmagamento da uva até o vinho a acidez total da uva Merlot, foi reduzida de 120,0 meq L⁻¹ para 93,0 meq L⁻¹. Resultados semelhantes foram encontrados por RIZZON & MIELE (2002), em duas cultivares viníferas, com uma redução mais acentuada da acidez no período que vai do esmagamento à descuba, seguido de uma pequena diminuição da descuba até o final da estabilização tartárica.

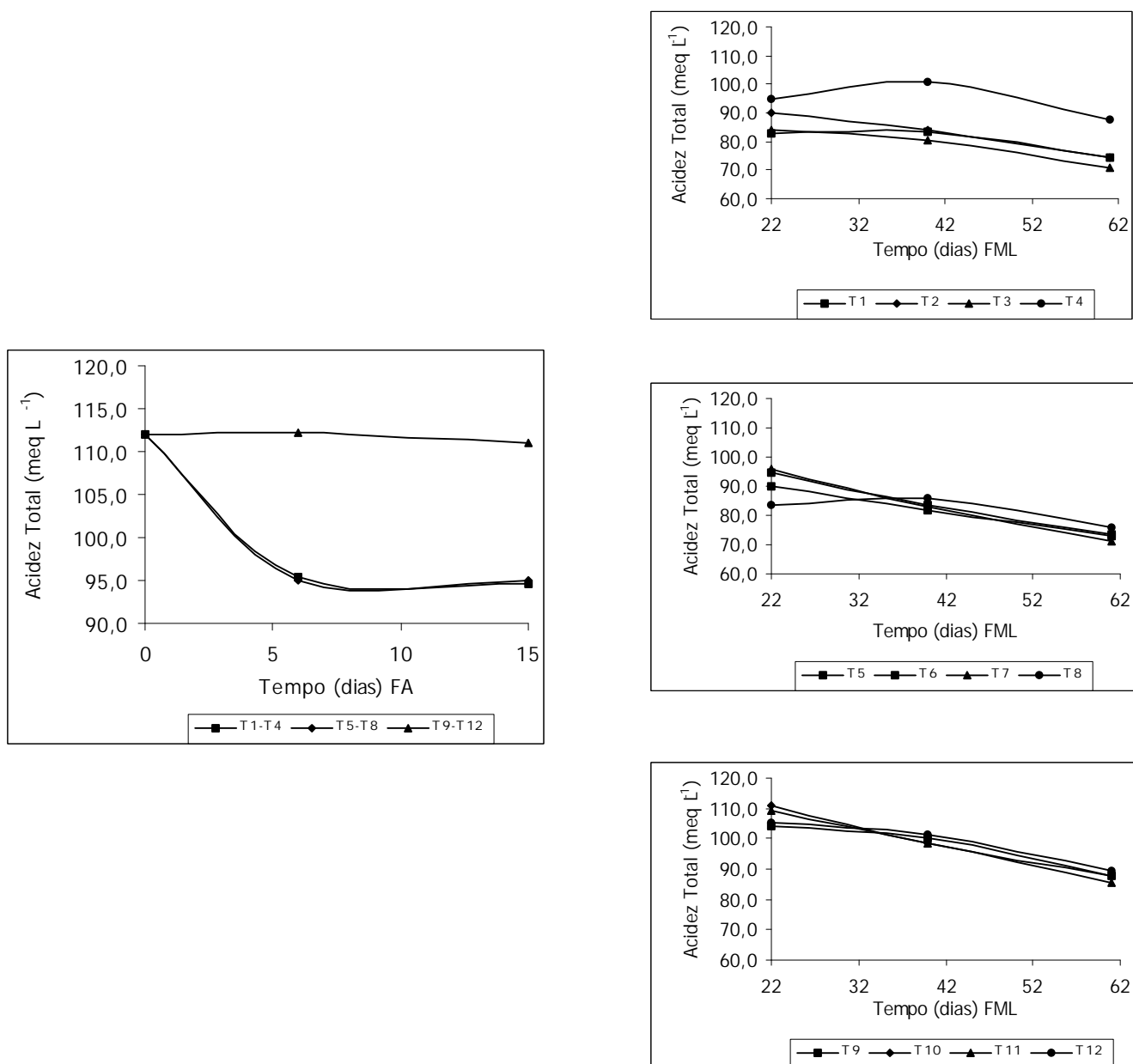


FIGURA 3. Comportamento da acidez total (meq L⁻¹) durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001. Fermentação alcoólica: T1–T4: leveduras naturais; T5-T8: *Saccharomyces bayanus*; T9-T12: *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação maloláctica: T1-T5-T9: bactérias naturais; T2-T6-T10: *Oenococcus oeni* DSM 7008; T3-T7-T11: *Oenococcus oeni* DSM 12923; T4-T8-T12: *Lactobacillus plantarum* DSM 4361.

4.1.4. Acidez volátil

A acidez volátil durante a elaboração do vinho aumentou consideravelmente, chegando ao final do processo, com valores entre 7,3 meq L⁻¹ e 10,3 meq L⁻¹, sendo estes valores, representados pelos modelos de regressão quadrática, raiz quadrada e linear. Nos tratamentos nos quais não foram adicionadas leveduras selecionadas para a realização da fermentação alcoólica, ou seja, nos tratamentos de T1 a T4, os valores da acidez volátil foram superiores aos demais tratamentos. MARTÍNEZ et al. (1998) constataram que, utilizando-se culturas puras de leveduras na fermentação alcoólica, ocorre uma menor produção de acidez volátil. Outro fator importante a considerar é que a acidez volátil nos tratamentos T4 e T8 não apresentou o mesmo aumento dos tratamentos T1, T2, T3 e o T5, T6 e T7, respectivamente, após o início da fermentação maloláctica. Neste caso a bactéria *L. plantarum* pode ter contribuído para a menor produção de ácido acético em relação as demais (Figura 4).

Quando a fermentação maloláctica ocorre no vinho, o ácido cítrico pode ser parcial ou completamente degradado pelas bactérias lácticas na presença da enzima citrato liase (CAVIN et al., 2000) com a formação de ácido acético, responsável pelo aumento da acidez volátil durante o processo fermentativo. Ao transformar um mol de ácido cítrico pela citrato liase, ocorre a produção de 1,2 a 1,5 moles de ácido acético, uma quantidade pequena de ácido láctico e entre 0,2 e 0,3 moles de 2,3-butanodiol e acetoína, respectivamente (LONVAUD-FUNEL, 2000; USSEGLIO-TOMASSET, 1998).

Neste trabalho, a acidez volátil teve um aumento maior durante a fermentação maloláctica que durante a fermentação alcoólica. Segundo PEYNAUD (1984), a acidez volátil é um produto secundário da fermentação alcoólica, correspondendo ao conjunto dos ácidos graxos acetificados encontrados nos vinhos, como por exemplo, ácidos fórmico, acético e butírico (AMERINE & OUGH, 1976). Seus valores representam um indicativo do estado sanitário e da gravidade de algumas alterações microbiológicas que ocorrem no vinho (CABANIS, 2000). RIZZON et al. (1997), também identificaram que a fermentação maloláctica causa um

aumento significativo da acidez volátil, em trabalhos com vinhos Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon.

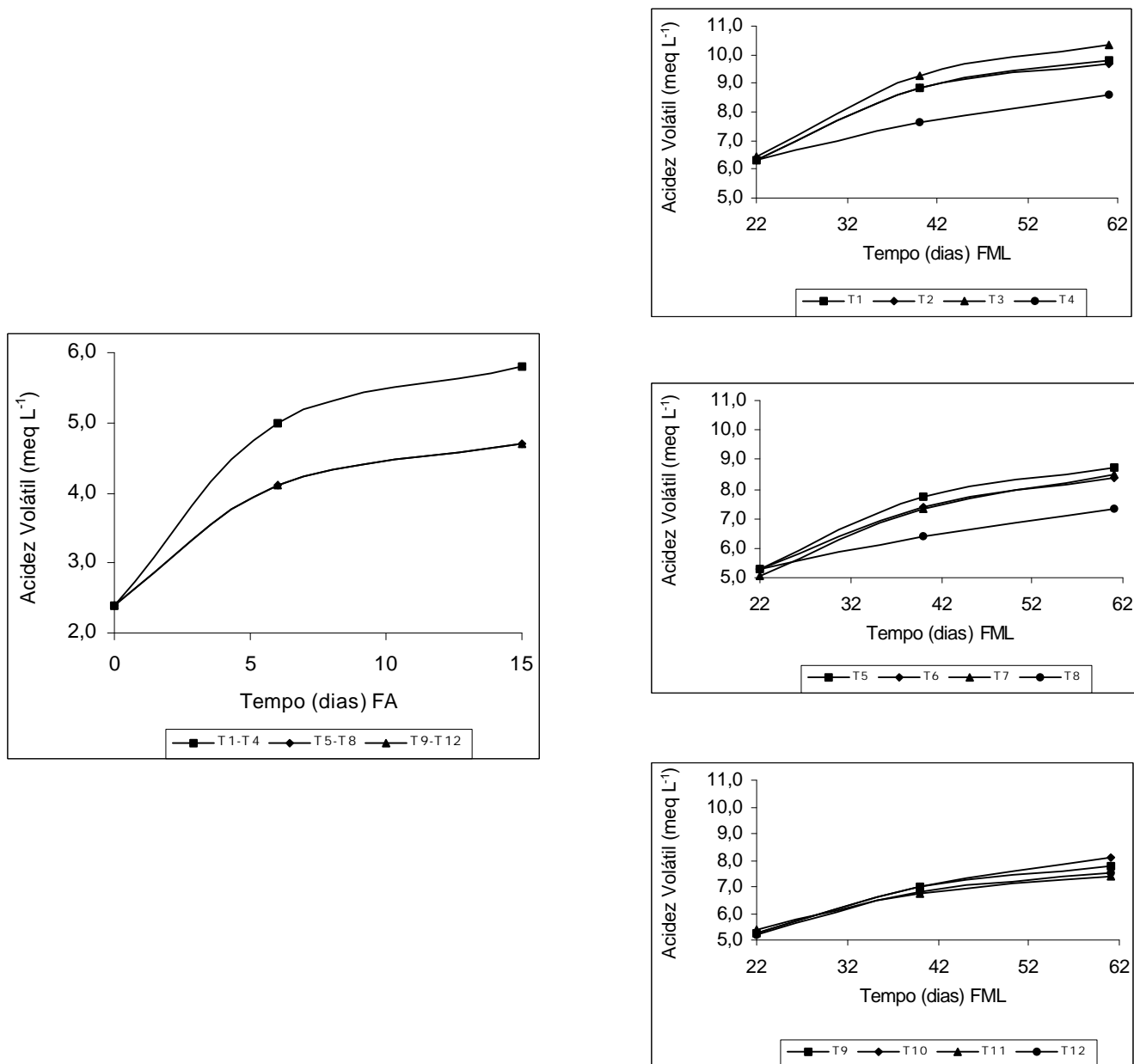


FIGURA 4. Comportamento da acidez volátil (meq L⁻¹) durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001. Fermentação alcoólica: T1-T4: leveduras naturais; T5-T8: *Saccharomyces bayanus*; T9-T12: *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação maloláctica: T1-T5-T9: bactérias naturais; T2-T6-T10: *Oenococcus oeni* DSM 7008; T3-T7-T11: *Oenococcus oeni* DSM 12923; T4-T8-T12: *Lactobacillus plantarum* DSM 4361.

4.1.5. Nitrogênio total

A concentração de nitrogênio total no mosto foi de 1141,1 mg L⁻¹ ocorrendo uma diminuição acentuada nos primeiros seis dias do início da fermentação alcoólica, sendo que a partir do sexto dia o consumo de nitrogênio foi mais lento. Os modelos de regressão são representados pela raiz quadrada. Segundo BOULTON et al. (1996), as concentrações de nitrogênio no mosto podem variar de 200,0 mg L⁻¹ a 2000,0 mg L⁻¹, sendo que na uva Merlot foi encontrado, pelo mesmo autor, 981,0 mg de nitrogênio por kg de uva. Os valores encontrados nesse trabalho estão de acordo com as concentrações encontradas pelos autores citados.

Nos tratamentos nos quais não foram adicionadas leveduras selecionadas, o consumo de nitrogênio foi maior, aproximadamente 20% a mais que os demais tratamentos (*Figura 5*). Durante a fermentação alcoólica, em torno de 2/3 do nitrogênio total presente no mosto foi consumido pelas leveduras, sendo que durante a fermentação maloláctica o consumo foi bem menor.

No início da fermentação maloláctica, a concentração de nitrogênio aumentou, possivelmente, devido à excreção de compostos nitrogenados pelas leveduras (autólise) e/ou biossíntese de substâncias nitrogenadas pelas bactérias.

Segundo KLIEWER (1968), 60% a 90% da concentração de nitrogênio em mostos de uvas está presente na forma de aminoácidos livres, sendo a arginina e a prolina os mais importantes entre as cultivares viníferas. O íon amônio e os aminoácidos glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico, asparagina, arginina, serina e alanina são possíveis fontes de nitrogênio para *Saccharomyces* (MONTEIRO & BISSON, 1991).

No trabalho realizado por DUTRA et al. (1999a), aproximadamente 79% dos aminoácidos livres no mosto da cultivar Chardonnay eram constituídos de prolina, treonina, arginina e alanina. DUTRA et al. (1999b), determinaram que na cultivar Cabernet Sauvignon, 75% dos aminoácidos livres eram prolina e arginina.

A diminuição intensa do nitrogênio presente no início da fase fermentativa está associada ao consumo pelas leveduras e precipitação por meio da reação dos taninos com as proteínas durante a fermentação alcoólica (BOULTON et al., 1996).

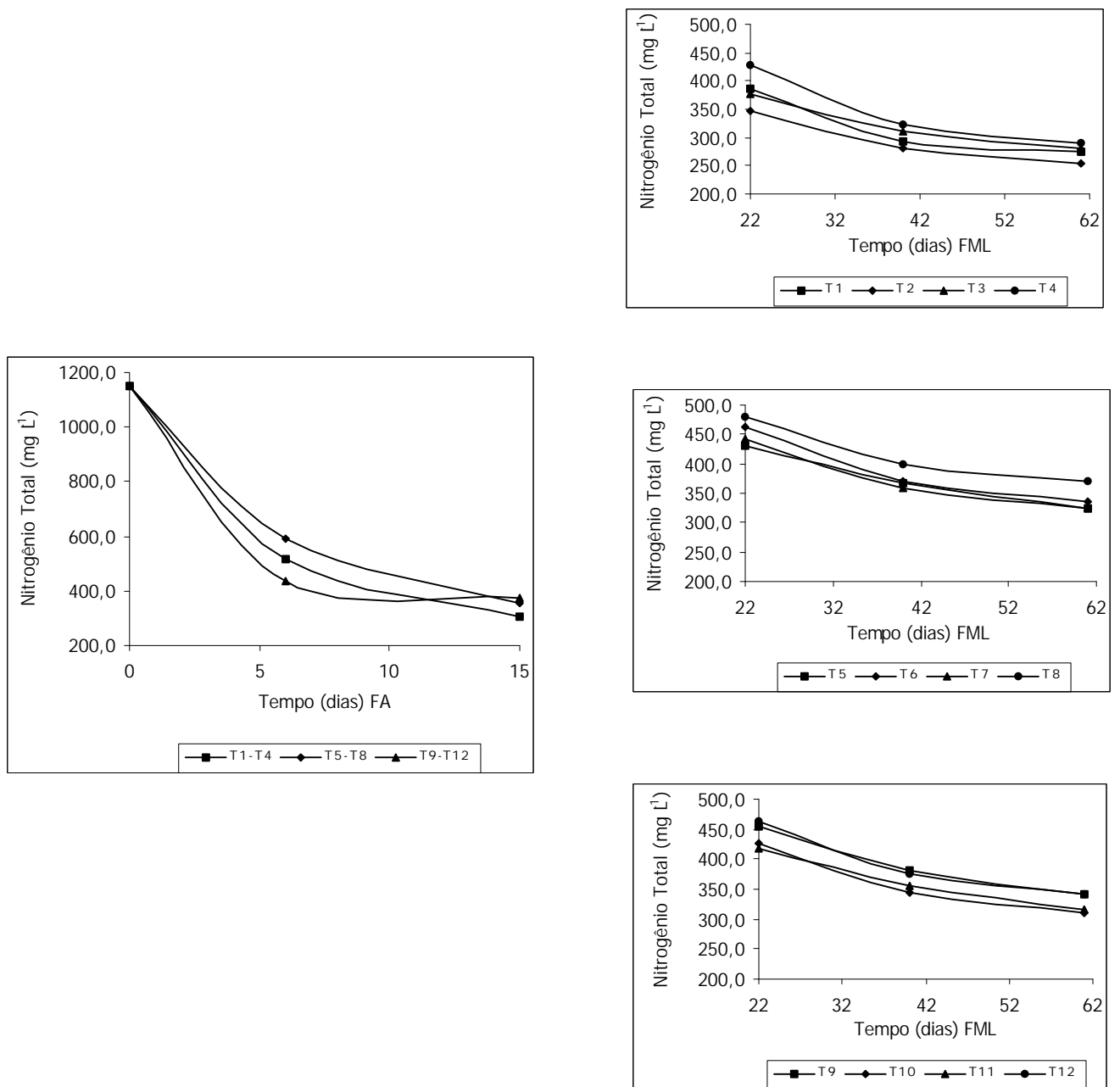


FIGURA 5. Comportamento do nitrogênio total (mg L^{-1}) durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001. Fermentação alcoólica: T1–T4: leveduras naturais; T5–T8: *Saccharomyces bayanus*; T9–T12: *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação maloláctica: T1–T5–T9: bactérias naturais; T2–T6–T10: *Oenococcus oeni* DSM 7008; T3–T7–T11: *Oenococcus oeni* DSM 12923; T4–T8–T12: *Lactobacillus plantarum* DSM 4361.

4.1.6. Ácido málico

A concentração de ácido málico no mosto foi em média $3,6 \text{ g L}^{-1}$, sendo degradado com maior intensidade a partir do 22º dia, quando do início da fermentação maloláctica. Após dezoito dias de inoculação das bactérias, dois dos tratamentos já haviam degradado totalmente o ácido málico (*Figura 6*). Os resultados de regressão são representados pelos modelos quadrático, cúbico e linear. Em trabalho realizado por RIZZON et al. (1997), verificou-se que em vinhos tintos submetidos à fermentação maloláctica, a degradação do ácido málico foi completa.

DELTEIL (2000) mostrou que ao se adicionar dois tipos de bactérias selecionadas na elaboração de vinhos, a duração da fermentação maloláctica foi mais rápida, de 7 e 13 dias, quando comparada com a flora natural presente na uva, de 30 dias.

A transformação do ácido málico em láctico é mais importante do ponto de vista qualitativo que quantitativo. São algumas gramas de ácido málico que são descarboxilados, provocando uma diminuição da acidez total, tornando o vinho mais agradável gustativamente (LONVAUD-FUNEL, 2001).

Outro fato a considerar é que, nos tratamentos em que as bactérias foram adicionadas juntamente com as leveduras, a concentração de ácido málico diminuiu rapidamente em relação aos demais. Pode-se confirmar essa explicação ao verificar o aumento da concentração de ácido láctico para os mesmos tratamentos (*Figura 7*). PRIETO et al. (2001) constataram que ao inocular as bactérias juntamente com as leveduras, a degradação do ácido málico é mais rápida que naqueles tratamentos nos quais foram inoculadas bactérias durante e ao final da fermentação alcoólica. Isto ocorreu, possivelmente, a uma maior adaptação das bactérias ao meio em fermentação. As diferenças entre os tratamentos foram, principalmente, no início da fermentação maloláctica. Em geral, as amostras inoculadas junto com as leveduras não tiveram uma fase de latência entre uma fermentação e outra. Segundo RIBÉREAU-GAYON (1985), a fermentação maloláctica é melhor conduzida quando a fermentação alcoólica é realizada por *S. cerevisiae* que por *S. bayanus*.

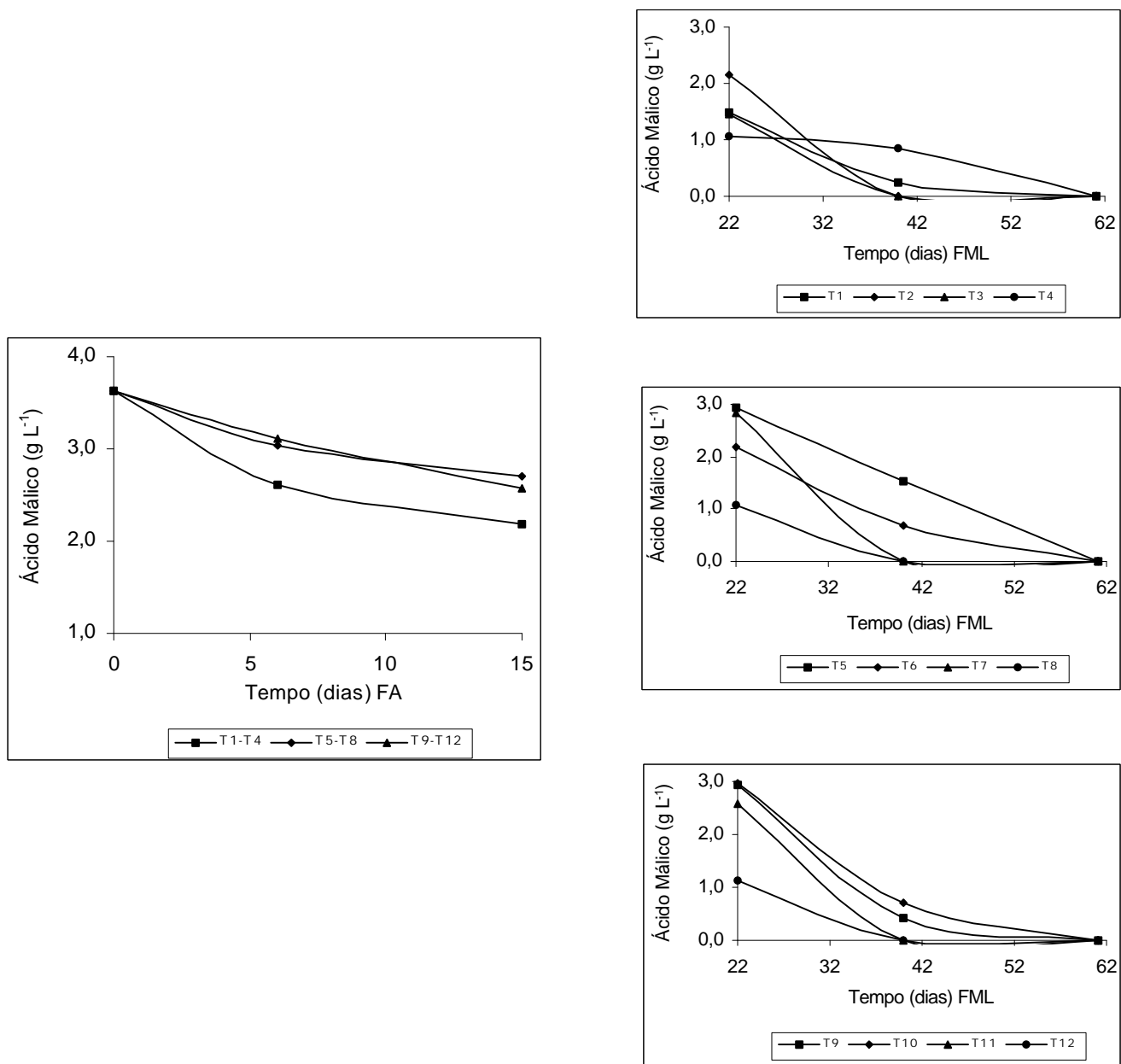


FIGURA 6. Comportamento do ácido málico (g L^{-1}) durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001. Fermentação alcoólica: T1–T4: leveduras naturais; T5–T8: *Saccharomyces bayanus*; T9–T12: *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação maloláctica: T1–T5–T9: bactérias naturais; T2–T6–T10: *Oenococcus oeni* DSM 7008; T3–T7–T11: *Oenococcus oeni* DSM 12923; T4–T8–T12: *Lactobacillus plantarum* DSM 4361.

O tempo de latência e a taxa de crescimento máximo da população bacteriana dependem diretamente de fatores como grau alcoólico, pH, concentração de dióxido de enxofre e temperatura do vinho (LONVAUD-FUNEL, 2001).

Após degradar todo o ácido málico, as bactérias podem utilizar para seu metabolismo outros compostos, como ácido cítrico e açúcares residuais. É nessa fase que ocorre aumento da acidez volátil e a produção de aromas lácticos intensos. Se o processo continuar, pode ocorrer o desenvolvimento de outros microrganismos contaminantes como *Brettanomyces*, *Lactobacillus* e *Pediococcus* (DELTEIL, 2000).

GERLAND & GERBAUX (1999), trabalhando com quatro bactérias lácticas em vinho Merlot, constataram que o tratamento testemunha, sem bactéria, levou aproximadamente 37 dias para degradar o ácido málico, enquanto nos demais tratamentos (com bactérias), houve uma variação de 10 a 21 dias para completar a fermentação maloláctica, portanto, idêntico aos resultados obtidos no presente trabalho.

PILATTE & NIELSEN (1999), mostraram que o ácido málico de vinho Chardonnay ($3,5 \text{ g L}^{-1}$) foi metabolizado pelas bactérias em 50 dias a temperatura entre 18°C e 22°C e concentração de dióxido de enxofre de 30 mg L^{-1} . GERBAUX (1998) em 37 dias e PILATTE (1998) entre 14 e 24 dias.

4.1.6.2. Ácido láctico

A concentração inicial de ácido láctico no mosto foi de $2,4 \text{ g L}^{-1}$, aumentando lentamente até o final da fermentação alcoólica. Os resultados encontrados por meio de análise de regressão são representados pelos modelos quadrático, raiz quadrada e linear. Ao iniciar a fermentação maloláctica, o aumento foi mais acentuado, chegando no final com valores médios de $6,4 \text{ g L}^{-1}$ (*Figura 7*). Aos seis dias após o início da fermentação alcoólica, os tratamentos onde foram adicionadas as bactérias lácticas juntamente com as leveduras (T4, T8 e T12), a concentração de ácido láctico foi maior. Isso indica que no transcorrer da fermentação alcoólica *L. plantarum* degradou o ácido málico em láctico.

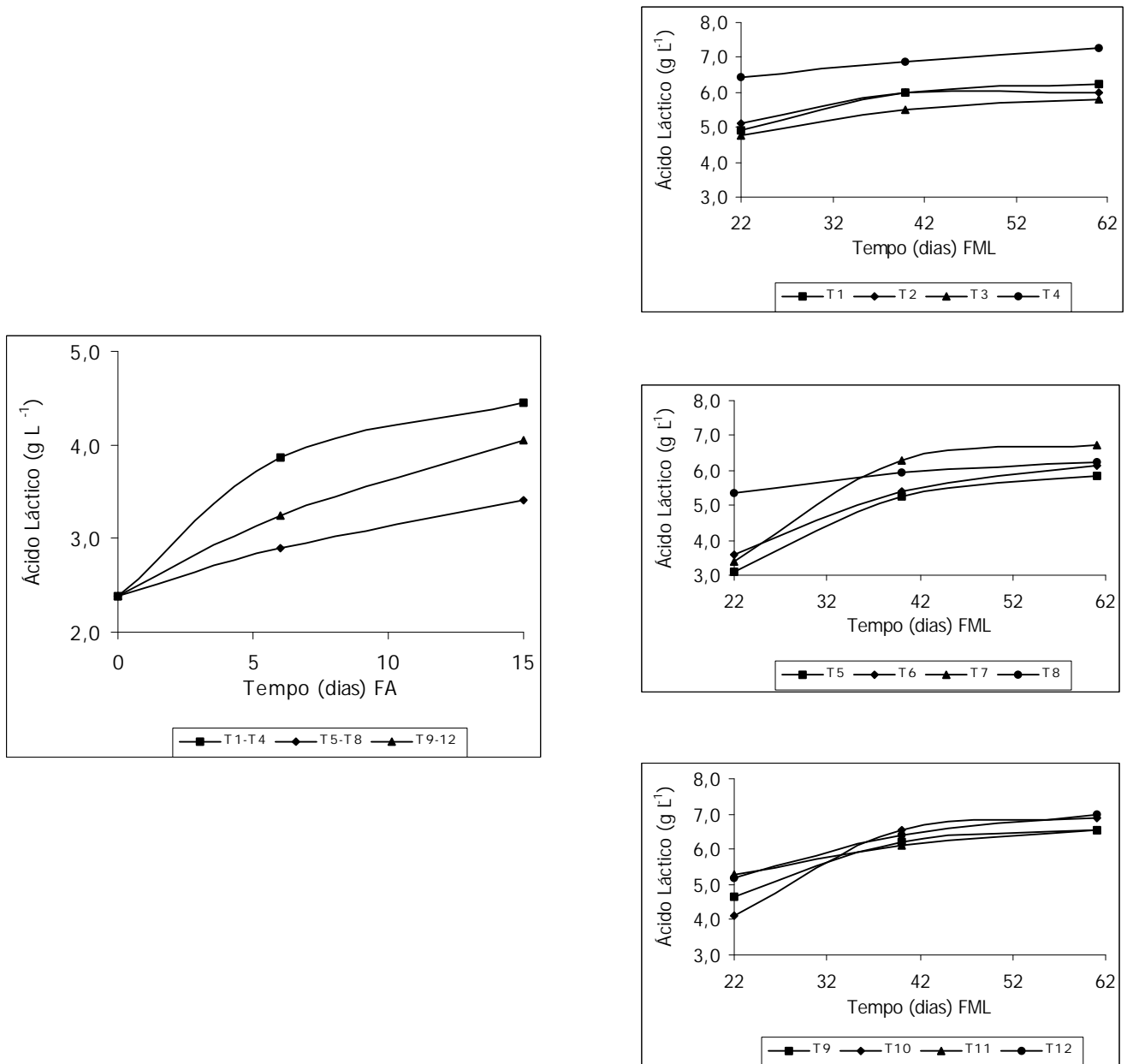


FIGURA 7. Comportamento do ácido láctico (g L^{-1}) durante as fermentações alcoólica (FA) e maloláctica (FML) da uva Merlot na safra 2001. Fermentação alcoólica: T1-T4: leveduras naturais; T5-T8: *Saccharomyces bayanus*; T9-T12: *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação maloláctica: T1-T5-T9: bactérias naturais; T2-T6-T10: *Oenococcus oeni* DSM 7008; T3-T7-T11: *Oenococcus oeni* DSM 12923; T4-T8-T12: *Lactobacillus plantarum* DSM 4361.

VIDAL-CAROU et al. (1990a), trabalhando com a elaboração de três tipos de vinhos tintos num período de aproximadamente 60 dias após o esmagamento da uva, mostrou que a produção de ácido láctico variou de 1,1 g L⁻¹ a 1,2 g L⁻¹ após degradação total do ácido málico existente. DELAQUIS et al. (2000) encontrou concentrações de 3,5 g L⁻¹ e 3,7 g L⁻¹ de ácido láctico após a realização da fermentação maloláctica conduzida com duas culturas puras de bactérias malolácticas.

MARTINEAU & HENICK-KLING (1995) encontraram em vinhos tintos, sem fermentação maloláctica, concentrações de ácido láctico na faixa de 0,3 g L⁻¹ a 0,5 g L⁻¹ e em vinhos submetidos a fermentação maloláctica, concentrações entre 3,5 g L⁻¹ e 6,1 g L⁻¹.

Em tratamentos com inoculação conjunta de leveduras e bactérias, a fermentação maloláctica iniciou-se mais cedo. Isto pode ser importante em vinhos que apresentam atraso para iniciar a fermentação maloláctica. Em contra partida, é um aspecto negativo em casos onde ocorre mais lentamente a fermentação alcoólica (PRIETO et al., 2001).

4.1.6.3. Ácido tartárico

Observou-se uma diminuição significativa no teor do ácido tartárico durante a vinificação. A concentração inicial de ácido tartárico no mosto foi de 7,1 g L⁻¹ e no vinho variou de 4,9 g L⁻¹ a 5,5 g L⁻¹ (*Figura 8*).

RIZZON & MIELE (2002) verificaram que a concentração de ácido tartárico nas cultivares viníferas sofre uma redução acentuada entre a fase de esmagamento da uva e a descuba, e nas demais fases, constatou-se uma pequena redução, até a estabilização tartárica. Constatou-se também (RIZZON et al., 1998), que a redução de ácido tartárico na uva Merlot foi significativa, passando de 7,9 g L⁻¹ no esmagamento para 3,2 g L⁻¹ no final da estabilização tartárica.

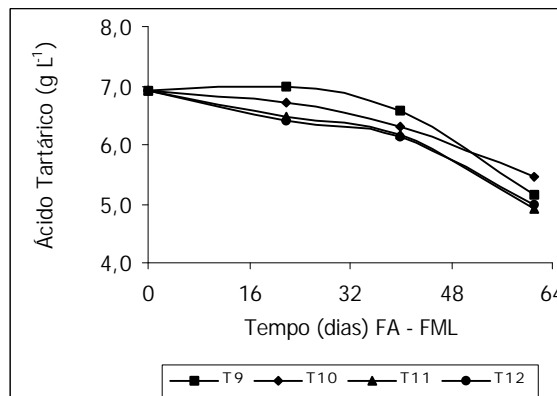
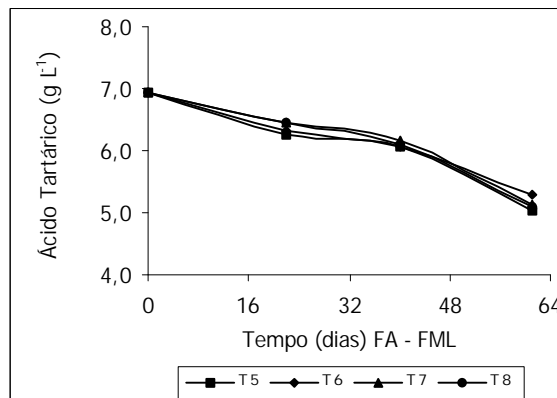
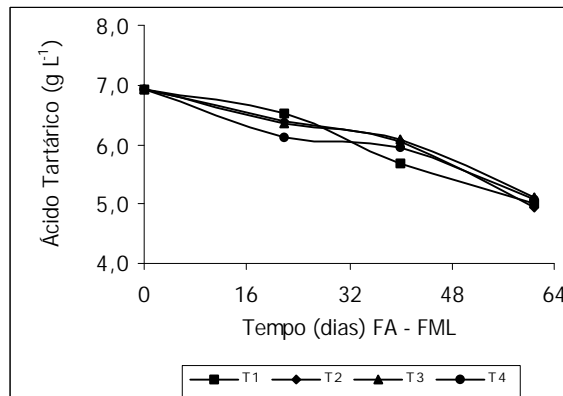


FIGURA 8. Comportamento do ácido tartárico (g L^{-1}) durante as fermentações alcoólica e maloláctica (FA – FML) da uva Merlot na safra 2001. Fermentação alcoólica: T1–T4: leveduras naturais; T5-T8: *Saccharomyces bayanus*; T9-T12: *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação maloláctica: T1-T5-T9: bactérias naturais; T2-T6-T10: *Oenococcus oeni* DSM 7008; T3-T7-T11: *Oenococcus oeni* DSM 12923; T4-T8-T12: *Lactobacillus plantarum* DSM 4361.

4.2. Composição físico-química do vinho Merlot

4.2.1. Densidade

A densidade do vinho é consequência da graduação alcoólica, de sólidos solúveis e não solúveis. A densidade do vinho foi maior nos tratamentos T9, T10, T11 e T12, onde foi utilizado *S. cerevisiae* e também no tratamento T4, na ausência de levedura e presença da *L. plantarum*, diferindo significativamente ($P < 0,01$) dos demais tratamentos (Tabela 6). Pode-se afirmar que os valores encontrados para a densidade são habituais para vinhos Merlot daquela região.

TABELA 6. Análises de densidade (g mL^{-1} à 20/20°C), álcool (% v/v - 20°C), acidez total (meq L^{-1}), acidez volátil (meq L^{-1}) e acidez fixa (meq L^{-1}) do vinho Merlot elaborado na safra 2001.

Tratamentos	Densidade ¹	Álcool	Acidez total	Acidez volátil	Acidez fixa
T 1	0,9952 b	10,1 abc	72,7 b	9,8 ab	62,9 cd
T 2	0,9952 b	10,1 abc	72,0 b	9,3 abc	63,3 cd
T 3	0,9951 b	10,0 abc	72,0 b	10,3 a	61,7 cd
T 4	0,9963 a	9,9 bc	84,7 a	8,3 bcd	76,4 a
T 5	0,9951 b	10,1 abc	72,0 b	8,5 abcd	63,5 cd
T 6	0,9953 b	9,9 abc	72,7 b	8,3 bcd	64,4 cd
T 7	0,9949 b	10,3 a	69,3 b	8,3 bcd	61,1 d
T 8	0,9950 b	10,2 ab	76,0 b	7,3 d	68,7 bc
T 9	0,9963 a	9,8 c	84,7 a	7,8 cd	76,9 a
T 10	0,9963 a	9,9 abc	84,0 a	7,9 bcd	76,1 ab
T 11	0,9963 a	9,8 bc	86,0 a	7,3 d	78,7 a
T 12	0,9966 a	9,8 bc	87,3 a	7,1 d	80,3 a
CV (%)	0,02	1,23	2,50	6,41	3,00

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

4.2.2. Graduação alcoólica

A graduação alcoólica variou de 9,8% a 10,3% v/v, não se caracterizando alguma tendência de agrupamento com relação a este parâmetro (*Tabela 6*).

PRIETO et al. (2001), não demonstrou diferenças significativas com relação ao teor alcoólico em dez tratamentos diferenciados por leveduras e bactérias. Segundo JENSON & RICHARDSON (1999), a produção de álcool a partir do açúcar disponível pode variar em função dos parâmetros de crescimento dos diferentes metabólitos sintetizados e a eficiência de crescimento.

A medida de produção total e final de etanol não é um parâmetro suficiente para se avaliar a melhor adequação microbiológica ao processo fermentativo. Mesmo em situações onde as concentrações de etanol sejam semelhantes ao final do processo, alguns dados cinéticos, tais como produtividade X tempo, produtividade por grama de substrato, produtividade por grama de célula, podem demonstrar diferenças de eficiência (FRONZA, 1997)

4.2.3. Acidez total

A acidez total foi maior nos tratamentos conduzidos por *S. cerevisiae* (T9, T10, T11 e T12) e leveduras naturais (T4), diferindo significativamente ($P < 0,01$) dos demais tratamentos (*Tabela 6*). Existiu uma tendência da acidez total ser sensivelmente maior nos tratamentos onde *L. plantarum* foi utilizada, em relação as demais bactérias, mesmo não havendo diferenças significativas.

Segundo BOULTON et al. (1996), a fermentação maloláctica pode influenciar a qualidade do vinho em relação à acidez total. A diminuição da acidez pode oscilar entre 0,15 g L⁻¹ e 0,30 e 3 g L⁻¹ (expressa em ácido tartárico) com aumento do pH de 0,15 a 0,30 unidades, dependendo da concentração dos ácidos málico e tartárico. Os vinhos produzidos em regiões frias têm uma alta concentração em ácidos, podendo beneficiar-se com a desacidificação pela fermentação maloláctica.

Ao comparar dois vinhos sem e com a realização da fermentação maloláctica, PALADINO et al. (2001) evidenciaram uma diminuição da acidez total do vinho, passando de 5,0 g L⁻¹ para 3,9 g L⁻¹ (expressa em ácido tartárico).

4.2.4. Acidez volátil

A acidez volátil teve uma tendência a ser mais elevada nos tratamentos que não utilizaram leveduras selecionadas para realizar a fermentação alcoólica e os valores mostram a tendência de serem menores nos tratamentos que utilizaram *S. cerevisiae*, mesmo que esta diferença não seja significativa (*Tabela 6*). Este parâmetro é importante para a qualidade do vinho, tendo sido estudado com relação a diferentes cultivares de uva (THEODORE & GERLAND, 1998), presença da fermentação maloláctica (PALADINO et al., 2001) e tipo de microrganismo (PRIETO et al., 2001).

As bactérias lácticas naturais presentes na uva podem produzir acidez volátil quando degradam os açúcares no início da fermentação alcoólica, por isso a necessidade da sulfitagem imediatamente após o esmagamento (DELTEIL, 2000).

4.2.5. Acidez fixa

A acidez fixa seguiu a tendência da acidez total, sendo maior ($P < 0,01$) nos tratamentos conduzidos com *S. cerevisiae* (T9, T10, T11 e T12) e no tratamento T4 (*Tabela 6*).

4.2.6. pH

O pH do vinho diferiu significativamente ($P < 0,01$) entre os tratamentos T7 e T4 (3,42 e 3,34, respectivamente) sendo que os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas (*Tabela 7*).

Após o esmagamento da uva e preparo do mosto, o pH foi de 3,24, e no vinho acabado ficou entre 3,34 e 3,42, variando de 0,10 a 0,18 unidades. Estes valores demonstram pequena elevação do pH após a fermentação maloláctica. Neste

sentido, a transformação do mosto em vinho, o pH tende a aumentar por consequência da extração de potássio na maceração, degradação do ácido málico na fermentação maloláctica e posterior precipitação do ácido tartárico na forma de bitartarato durante o tratamento do vinho pelo frio. Resultado idêntico foi encontrado por BOULTON et al. (1996) observando que o aumento do pH do vinho após a fermentação maloláctica pode ser de 0,15 a 0,30 unidades, dependendo da concentração de ácido málico, do pH inicial do mosto e do desenvolvimento de atividade microbiana.

TABELA 7. Análises de pH, açúcares redutores (g L^{-1}), extrato seco (g L^{-1}), extrato seco reduzido (g L^{-1}) e relação álcool/extrato seco reduzido do vinho Merlot elaborado na safra 2001.

Tratamentos	pH ¹	Açúcares redutores	Extrato seco	Extrato seco reduzido	Álcool/extrato seco
T 1	3,40 ab	1,95 a	18,99 a	18,03 a	4,49 a
T 2	3,37 ab	2,07 a	19,25 a	18,19 a	4,47 a
T 3	3,38 ab	1,94 a	18,27 a	17,32 a	4,63 a
T 4	3,34 b	2,09 a	21,05 a	19,97 a	3,95 a
T 5	3,41 ab	2,13 a	20,97 a	19,84 a	4,18 a
T 6	3,41 ab	1,99 a	18,11 a	17,11 a	4,64 a
T 7	3,42 a	2,10 a	18,27 a	17,16 a	4,80 a
T 8	3,39 ab	2,07 a	18,07 a	17,00 a	4,80 a
T 9	3,35 ab	1,94 a	20,17 a	19,23 a	4,05 a
T 10	3,37 ab	2,03 a	20,59 a	19,56 a	4,06 a
T 11	3,38 ab	2,00 a	20,94 a	19,94 a	3,93 a
T 12	3,38 ab	2,25 a	21,49 a	20,24 a	3,90 a
CV (%)	0,65	6,93	6,93	7,35	6,04

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

PALADINO et al. (2001), mostraram que o pH do vinho onde realizou a fermentação maloláctica foi de 4,01 em relação ao tratamento controle, 3,82, ou seja, 0,19 unidades a menos, respectivamente.

4.2.7. Açúcares redutores

Os açúcares da uva, glicose e frutose, originam-se da hidrólise enzimática da sacarose formada durante a assimilação da clorofila. A glicose também origina-se da hidrólise do amido na videira. Na uva madura, as concentrações máximas dessas hexoses oscilam entre 150,0 g L⁻¹ e 350,0 g L⁻¹, variando entre cada cultivar (CABANIS, 2000).

A concentração de açúcares redutores no vinho não diferiu significativamente ($P > 0,01$) entre os tratamentos (*Tabela 7*). Normalmente, a concentração de açúcares redutores nos vinhos brasileiros fica abaixo de 3,0 g L⁻¹. Segundo CABANIS (2000), nos mostos e vinhos encontram-se pequenas quantidades de arabinose, xilose e ribose. Segundo este autor, os açúcares não fermentescíveis, encontram-se no vinho numa concentração inferior a 2,0 g L⁻¹.

PRIETO et al. (2001), conduzindo dez fermentações em diferentes tratamentos utilizando leveduras e bactérias, constataram que não ocorreram diferenças significativas na concentração de açúcares entre os tratamentos, variando de 1,1 g L⁻¹ a 1,5 g L⁻¹ no final do processamento.

4.2.8. Extrato seco

O extrato seco representa a quantidade de substâncias fixas que não volatilizam em determinadas condições físicas (AMERINE & OUGH, 1976). Seus valores são função direta da relação entre as fases sólida e líquida do mosto. Pois em determinadas safras vitícolas que ocorre precipitação pluviométrica em demasia, está relação fica prejudicada pela dissolução da maioria dos compostos que fazem parte desta variável. A concentração de extrato seco variou de 18,07 g L⁻¹ a 21,49 g L⁻¹, não diferindo significativamente ($P > 0,01$) entre os tratamentos (*Tabela 7*). Nas fermentações que utilizaram a *S. cerevisiae*, houve uma tendência do extrato seco

ser maior que os demais. O extrato seco reduzido, que representa o extrato seco descontado do açúcar residual superior a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ também foi igual em todos os tratamentos, seguindo a mesma tendência que o extrato seco (*Tabela 7*).

Segundo RIZZON et al. (1997), com relação às substâncias associadas às características de estrutura dos vinhos, observa-se que a fermentação maloláctica reduz os teores de extrato seco reduzido e aumenta o valor da relação álcool em peso/extrato seco reduzido em trabalhos com vinhos Cabernet.

4.2.9. Componentes da Cor

Os índices de cor, a coloração e a intensidade de cor do vinho Merlot encontram-se na *Tabela 8*.

O índice 420 que representa a cor amarela, é consequência da concentração de taninos e também das possíveis oxidações que o mosto ou o vinho possam sofrer durante o processamento. Neste trabalho os valores do índice 420 não foram afetados significativamente ($P > 0,01$) pelos tratamentos.

A cor vermelha medida pelo índice 520, representa um vinho jovem recém elaborado. A cor vermelha está diretamente relacionada com a concentração de antocianinas, do pH e dos níveis de dióxido de enxofre, podendo alterar a intensidade de cor (RIBÉREAU-GAYON et al., 1976; USSEGLIO-TOMASSET, 1998). O índice 520 foi maior que o 420, mostrando a predominância da cor vermelha sobre a amarela, natural dos vinhos jovens. Da mesma maneira que o índice 420, o valor do índice 520 não foi afetado significativamente ($P > 0,01$) pelos tratamentos. Para o índice 620, que representa a cor roxa, ocorreram variações significativas ($P < 0,01$) em função dos diferentes tratamentos.

RIZZON et al. (1997) observaram que a fermentação maloláctica provoca uma diminuição acentuada nas cores amarela e vermelha, avaliadas a 420 e 520 nm, respectivamente.

TABELA 8. Análises dos Índices 420, 520 e 620, coloração (I420/I520) e intensidade de cor (I420+520+620) do vinho Merlot elaborado na safra 2001.

Tratamentos	I420 ¹	I520	I620	Coloração	Intensidade de cor
T 1	0,157 a	0,211 a	0,030 b	0,75 a	0,398 a
T 2	0,170 a	0,244 a	0,036 b	0,70 a	0,450 a
T 3	0,157 a	0,240 a	0,032 b	0,66 a	0,430 a
T 4	0,157 a	0,238 a	0,029 b	0,66 a	0,424 a
T 5	0,174 a	0,269 a	0,037 ab	0,65 a	0,480 a
T 6	0,161 a	0,254 a	0,034 b	0,63 a	0,449 a
T 7	0,178 a	0,249 a	0,046 a	0,72 a	0,474 a
T 8	0,160 a	0,237 a	0,036 b	0,68 a	0,433 a
T 9	0,166 a	0,225 a	0,036 ab	0,74 a	0,427 a
T 10	0,178 a	0,240 a	0,039 ab	0,74 a	0,457 a
T 11	0,174 a	0,238 a	0,036 b	0,73 a	0,447 a
T 12	0,178 a	0,246 a	0,033 b	0,73 a	0,457 a
CV (%)	6,26	7,89	8,31	8,34	5,89

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Coloração

A coloração representa a relação do índice 420/520. Quanto mais envelhecido for o vinho, a coloração aproxima-se de 1,0 devido à maior oxidação do vinho, predominando, com o passar do tempo, a cor amarela.

No presente estudo, a coloração não diferiu significativamente entre os tratamentos ($P > 0,01$), variando de 0,63 a 0,75. Por se tratar de um vinho jovem, os valores foram baixos, pois o índice 520 foi maior que o 420. Nos tratamentos que utilizaram *S. cerevisiae*, a coloração foi sensivelmente maior que os tratamentos que

utilizaram *S. bayanus*, embora estas diferenças não tenham sido comprovadas estatisticamente.

O pH exerce importante efeito na cor do vinho, no sabor e na proporção entre dióxido de enxofre livre e combinado. Para que o vinho atinja níveis satisfatórios destas características, o pH deve ficar entre 3,1 e 3,6 (AMERINE & OUGH, 1976).

Intensidade de cor

A intensidade de cor representa a soma dos índices 420, 520 e 620, ou seja, as diferentes cores medidas do espectro visível. Esta variável também não diferiu significativamente ($P > 0,01$) entre os tratamentos.

Segundo BOULTON et al. (1996), a fermentação maloláctica provoca uma diminuição significativa na intensidade e na qualidade da cor nos vinhos tintos. Dependendo do pH, a cor do vinho pode desenvolver tintos violetas. Durante a fermentação maloláctica, realizada por bactérias do gênero *Oenococcus sp*, pode ocorrer uma diminuição de até 30% na intensidade de cor do vinho. A causa mais discutida é a ocorrência de um deslocamento na configuração dos pigmentos antocianínicos resultante do incremento do pH do vinho. Os pigmentos antocianínicos são compostos anfóteros e a pH 3,5 o equilíbrio químico está deslocado para o íon flavilium, de cor roxa. Ao aumentar o pH, o equilíbrio se desloca para uma forma quinônica, de cor azul-violeta.

Outra possibilidade é a redução das antocianinas a leucoformas correspondentes pelo catabolismo bacteriano do ácido cítrico que fornece NADH, necessário para a reação. Também pode ocorrer uma descoloração das antocianinas por ação do dióxido de enxofre. O consumo por parte das bactérias láctica, dos compostos habitualmente combinados com o dióxido de enxofre (α -cetogluturato, piruvato e acetaldeído), libera o SO_2 ativo. O dióxido de enxofre livre reage com as antocianinas formando leucocompostos, e em consequência diminui a intensidade corante do vinho (DAVIS et al., 1985).

Trabalhos realizados por PALADINO et al. (2001) e THÉODORE & GERLAND (1998) mostram que a intensidade de cor no vinho tinto é de 1,026 e

0,764, sem e com realização da fermentação maloláctica, respectivamente. A diminuição da intensidade de cor no vinho com a fermentação maloláctica foi devido ao aumento de pH, pois a concentração de antocianinas totais foi praticamente semelhante no vinho testemunha, sendo o estado de ionização diferente.

4.2.10. Cinzas e Alcalinidade das cinzas

As cinzas representam elementos minerais presentes no vinho e geralmente correspondem a 10% do extrato seco reduzido, correspondendo à matéria inorgânica que resta depois de se evaporar e incinerar mostos ou vinhos (AMERINE & OUGH, 1976). Neste trabalho a concentração de cinzas variou de 1,75 g L⁻¹ a 2,15 g L⁻¹ não diferindo significativamente ($P > 0,01$) entre os tratamentos. Estes valores representam uma variação de 9,21% a 10,00% do extrato seco, portanto dentro dos padrões mínimos estabelecidos pela legislação, que é de 1,5 g L⁻¹. Observou-se que nos tratamentos com leveduras e bactérias naturais a concentração de cinzas foi menor que os demais (*Tabela 9*).

Os valores de alcalinidade das cinzas diferiram estatisticamente somente nos tratamentos 3 em relação aos tratamentos T11 e T12, não seguindo a tendência dos valores das cinzas (*Tabela 4*). Durante a calcinação do vinho se destroem os ácidos orgânicos livres e seus sais se transformam em carbonatos. A alcalinidade das cinzas é uma medida da quantidade de sais de ácidos orgânicos presentes no mosto ou no vinho (RIZZON & GATTO, 1987).

4.2.11. Antocianinas

As antocianinas estão localizadas na película das bagas (USSEGLIO-TOMASSET, 1998) e são os únicos pigmentos que atribuem cor vermelha nas uvas tintas (AMERINE & OUGH, 1976).

A concentração de antocianinas variou de 101,4 g L⁻¹ a 130,6 g L⁻¹, não ocorrendo diferenças significativas com relação ao tipo de microrganismo empregado (*Tabela 9*). A concentração de antocianinas ficou muito abaixo da maioria dos

trabalhos realizados nessa mesma região com o vinho Merlot e outros vinhos (MANFROI, 1997; RIZZON & MIELE, 2001).

TABELA 9. Análise das cinzas (g L^{-1}), alcalinidade das cinzas (meq L^{-1}), antocianinas (mg L^{-1}), polifenóis totais (I 280) e taninos (g L^{-1}) do vinho Merlot elaborado na safra 2001.

Tratamentos	Cinzas ¹	Alcalinidade das cinzas	Antocianinas	Polifenóis Totais	Taninos
T 1	1,75 a	22,5 ab	102,1 a	19,50 cd	0,79 a
T 2	1,80 a	22,8 ab	130,6 a	19,60 cd	0,94 a
T 3	1,87 a	21,2 b	121,2 a	19,53 cd	0,87 a
T 4	1,95 a	23,0 ab	109,3 a	19,17 d	0,77 a
T 5	1,82 a	22,0 ab	123,9 a	20,67 bcd	0,95 a
T 6	1,95 a	22,7 ab	123,1 a	19,67 cd	0,89 a
T 7	1,78 a	23,5 ab	114,1 a	23,17 ab	0,99 a
T 8	1,83 a	23,0 ab	130,5 a	23,03 ab	0,82 a
T 9	1,93 a	23,5 ab	101,4 a	22,43 ab	0,83 a
T 10	1,90 a	23,0 ab	108,8 a	23,97 a	0,86 a
T 11	2,05 a	24,3 a	109,9 a	22,20 abc	0,87 a
T 12	2,15 a	24,2 a	122,2 a	22,13 abc	0,81 a
CV (%)	6,66	3,48	10,63	3,61	10,23

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

PALADINO et al. (2001) verificaram que a fermentação maloláctica não alterou significativamente a concentração de antocianinas totais quando comparada com a testemunha, $657,8 \text{ mg L}^{-1}$ e $673,6 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

RIZZON et al. (1997) verificaram uma diminuição da intensidade de cor, associada ao arraste de pigmentos realizado por bactérias e ao aumento do pH dos

vinhos após a fermentação maloláctica; e PALADINO et al. (2001) também associaram a diminuição da intensidade de cor do vinho com o aumento de pH e da acidez volátil, assim como a diminuição da acidez total.

4.2.12. Polifenóis totais

A concentração de polifenóis totais foi maior nos tratamentos que utilizaram leveduras selecionadas, variando de 19,17 no tratamento T4 a 23,97 no tratamento T10 (*Tabela 9*). Como os polifenóis totais encontram-se na película da uva e a sua concentração está relacionada com o seu grau de maturação, pode-se afirmar que as leveduras selecionadas utilizadas nesse experimento colaboraram para sua maior extração elevando os níveis de polifenóis do vinho, mesmo que esses valores tenham ficado abaixo dos valores habituais para vinhos tintos da região, possivelmente, consequência das condições climáticas, que neste ano, não foram favoráveis à cultura da uva. Neste sentido, o trabalho desenvolvido por RIZZON et al. (1999), demonstram que ao aumentar a proporção de fase sólida em relação a líquida no mosto, o valor dos polifenóis totais, também aumenta.

PALADINO et al. (2001) encontraram valores semelhantes de polifenóis totais, 37,3 e 41,0 em vinhos submetidos ou não à fermentação maloláctica, respectivamente, não evidenciando a influência desta sobre a concentração final.

4.2.13. Taninos

Os compostos fenólicos variam desde compostos relativamente simples produzidos pela videira, até substâncias complexas, como os taninos. A concentração de taninos nos vinhos Merlot variaram de 0,77 g L⁻¹ a 0,99 g L⁻¹ entre os tratamentos, diferença esta, não significativa ($P > 0,01$) (*Tabela 9*). Estes valores, ficaram próximos dos resultados encontrados nos vinhos da região por outros autores (RIZZON et al., 1986; MANFROI, 1997; RIZZON & MIELE, 2001).

A concentração de taninos pode variar em função da temperatura e duração da maceração e o número de remontagens diárias realizadas no mosto até o momento da descuba. Como o trabalho foi realizado em condições de

microvinificações, com poucas remontagens diárias e sem influência de temperaturas altas, os valores ficaram relativamente baixos.

4.2.14. Dióxido de enxofre livre e total

A concentração de dióxido de enxofre utilizada no presente trabalho foi relativamente baixa por se tratar de microvinificações, onde o cuidado com a higiene e o controle do processo fermentativo é mais rigoroso. No vinho acabado a concentração de dióxido de enxofre livre variou de 8,13 mg L⁻¹ a 13,53 mg L⁻¹ e de dióxido de enxofre total, de 13,23 mg L⁻¹ a 20,87 mg L⁻¹ (*Tabela 10*). A dosagem aplicada antes e após a fermentação alcoólica deve ser relativamente baixa para que as bactérias responsáveis pela fermentação maloláctica possam desencadear mais rapidamente sua atividade, pois as mesmas são sensíveis a concentrações elevadas de dióxido de enxofre. Segundo trabalho realizado por DELTEIL (2000), a duração da fermentação maloláctica sem a adição de dióxido de enxofre no início da fermentação alcoólica teve uma duração de 7 dias, ao adicionar 3 mg L⁻¹ de dióxido de enxofre, o tempo foi de 12 dias e ao adicionar 10 mg L⁻¹, a mesma teve duração de 21 dias. Outro fator relevante é o tempo de duração da maceração na fermentação alcoólica. As macerações mais longas favorecem o desenvolvimento das bactérias lácticas, em particular pela maior combinação do dióxido de enxofre e do aumento do pH do meio (DELTEIL, 2000).

A concentração de dióxido de enxofre livre ao iniciar a fermentação maloláctica no vinho influencia diretamente o tempo de duração da mesma. Na pesquisa realizada por GERBAUX (1998), a fermentação maloláctica em ausência de dióxido de enxofre no vinho teve duração de 25 dias, enquanto que no vinho com concentração de 40 mg L⁻¹ e 80 mg L⁻¹ a duração foi de 44 e 74 dias, respectivamente. PRAHL et al. (1994) também observaram que o tempo de duração da fermentação maloláctica foi maior quanto maior a concentração de dióxido de enxofre. LONVAUD-FUNEL (2001) afirma que a concentração de dióxido de enxofre livre deverá ser menor que 5 mg L⁻¹ para que ocorra uma fermentação maloláctica eficaz e rápida.

TABELA 10. Análise de dióxido de enxofre livre (mg L^{-1}) e dióxido de enxofre total (mg L^{-1}) do vinho Merlot elaborado na safra 2001.

Tratamentos	Dióxido de enxofre livre ¹	Dióxido de Enxofre total
T 1	9,27 ab	16,53 abcd
T 2	9,60 ab	15,37 bcd
T 3	8,13 b	14,67 cd
T 4	9,43 ab	15,70 bcd
T 5	9,33 ab	13,23 d
T 6	10,53 ab	14,33 cd
T 7	13,53 a	18,60 abc
T 8	11,70 ab	20,27 ab
T 9	9,97 ab	19,07 abc
T 10	9,00 ab	20,87 a
T 11	11,23 ab	15,83 abcd
T 12	10,70 ab	15,43 bcd
CV (%)	12,87	8,67

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

4.2.15. Compostos voláteis

Aldeído acético (*Tabela 11*) não foi detectado em nenhum dos tratamentos aplicados. Normalmente este composto é encontrado nos vinhos em baixas concentrações. Isto se deve a forte atividade redutora da levedura durante a fermentação alcoólica, e por outro lado, à presença de dióxido de enxofre e de álcoois (principalmente etanol), que reagem, ao pH natural do vinho, com os

compostos carbonílicos para formar as combinações sulfíticas e acetatos (BAUMES, 2000).

A concentração de acetato de etila no vinho Merlot variou de 34,6 mg L⁻¹ a 74,5 mg L⁻¹. A presença deste éster no vinho tem origem biológica, sintetizado pelas leveduras primitivas e principalmente pelas bactérias acéticas, ou em simples reações de esterificação durante processos de maturação e envelhecimento dos vinhos (CURVELO-GARCIA, 1988). Concentrações elevadas, acima de 120,0 mg L⁻¹, estão associadas com descuidos na condução da fermentação alcoólica e maloláctica. Neste trabalho, pode-se observar que as concentrações de acetato de etila (*Tabela 11*) foram superiores nos tratamentos onde não ocorreu a inoculação de leveduras selecionadas, pois quando as fermentações ocorrem espontaneamente com microrganismos naturais a chance de contaminação é maior. Resultado idêntico foi encontrado por MANFROI (1997) em vinhos Cabernet da mesma região.

Segundo PEYNAUD (1984), o acetato de etila é percebido a partir de 120,0 mg L⁻¹, influenciando no retrogosto, com impressão de dureza e ardor. Acima de 160,0 mg L⁻¹ a 180,0 mg L⁻¹, torna-se agressivo ao olfato, devendo ser considerado como um fator de má qualidade para os vinhos.

A concentração de metanol variou de 143,3 mg L⁻¹ (tratamento T10) a 175,1 mg L⁻¹ (tratamento T8) (*Tabela 11*). O metanol é proveniente da hidrólise das pectinas, o que relaciona a sua concentração com a maior ou menor maceração das partes sólidas do cacho, em particular das películas da uva. Segundo CABANIS & CABANIS (2000), a concentração mínima e máxima de metanol em vinhos tintos é de 43,0 mg L⁻¹ e 320,0 mg L⁻¹. MANFROI (1997) encontrou uma concentração média de metanol em vinho Cabernet Franc de 101,7 mg L⁻¹.

Os álcoois superiores são formados durante a fermentação alcoólica, sendo eles responsáveis por parte dos complexos atributos sensoriais dos vinhos. São formados por vias microbiológicas anabólicas e catabólicas, estando associada à assimilação de fontes de nitrogênio pelas leveduras e ao consumo e produção de aminoácidos. Na via catabólica, os aminoácidos presentes no mosto são transaminados, resultando em α -cetoácidos, que são descarboxilados e reduzidos a álcool. Já a via anabólica, é originada com o piruvato e acetil CoA formados pelo metabolismo dos carboidratos do mosto, atuando como precursores da biossíntese

de todos os aminoácidos, dos quais o penúltimo estágio na biossíntese é a produção de α -cetoácidos que são transaminados para formar os respectivos aminoácidos.

Os quatro álcoois superiores que são produzidos principalmente pelas leveduras são: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol (DELFINI et al., 1999).

TABELA 11. Concentração (mg L^{-1}) de compostos voláteis no vinho Merlot elaborado na safra 2001.

Tratamentos	Aldeído Acético¹	Acetato de etila	Metanol	1-Propanol
T 1	ND	74,5 a	164,7 ab	22,6 d
T 2	ND	69,3 a	164,3 ab	21,1 d
T 3	ND	71,7 a	162,9 ab	20,8 d
T 4	ND	62,3 ab	164,7 ab	41,1 ab
T 5	ND	34,6 c	147,8 b	29,8 cd
T 6	ND	36,2 c	148,2 b	34,4 bc
T 7	ND	38,6 c	154,6 ab	29,7 cd
T 8	ND	34,8 c	175,1 a	30,2 cd
T 9	ND	46,4 bc	148,5 ab	44,7 a
T 10	ND	49,2 bc	143,3 b	47,0 a
T 11	ND	43,1 c	152,7 ab	41,5 ab
T 12	ND	43,3 c	161,6 ab	41,7 ab
CV (%)	-	11,61	5,74	10,01

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

TABELA 11. *Continuação ...*

Tratamentos	2-Metil	2-Metil	3-Metil	Soma dos
	1-Propanol ¹	1-Butanol	1-Butanol	Álcoois Superiores
T 1	77,3 a	57,0 cd	173,6 cd	327,5 cd
T 2	76,8 a	59,1 cd	179,5 cd	336,4 bcd
T 3	74,4 a	63,2 bc	192,2 bcd	350,5 bcd
T 4	54,4 b	53,1 d	163,6 d	312,1 d
T 5	56,8 b	72,4 a	233,3 ab	392,3 ab
T 6	55,4 b	70,7 ab	233,7 ab	394,1 ab
T 7	58,9 b	74,1 a	259,3 a	422,0 a
T 8	50,3 b	71,1 ab	218,2 abc	369,8 abcd
T 9	48,2 b	75,0 a	211,3 abcd	379,3 abc
T 10	49,3 b	75,0 a	208,6 abcd	379,9 abc
T 11	47,2 b	75,3 a	207,8 bcd	371,8 abc
T 12	47,0 b	71,1 ab	200,5 bcd	360,3 bcd
CV (%)	7,65	4,53	8,34	5,42

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A concentração de 1-propanol variou de 20,8 mg L⁻¹ a 47,0 mg L⁻¹, existindo diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os diferentes tratamentos (*Tabela 11*). Este álcool superior, ao contrário dos demais, que são originados a partir das vias metabólicas dos aminoácidos, tem origem a partir do ácido pirúvico e acetil-CoA (MARTÍNEZ et al., 1998). A sua concentração nos tratamentos que utilizaram *S. cerevisiae* e nos tratamentos T4 e T6 foram maiores em relação aos demais.

As concentrações elevadas de 1-propanol dependem do estado sanitário da uva e origina-se de contaminações bacterianas (DIRNINGER & SCHAEFFER, 1990). Segundo DELFINI et al. (1999), o 1-propanol está associado ao odor de álcool e de frutas. MANFROI (1997) encontrou resultados médios de 13,8 mg L⁻¹, bem abaixo do encontrado neste trabalho. CABANIS & CABANIS (2000) afirmam que os

valores deste álcool superior para vinhos tintos, geralmente, ficam abaixo de 68 mg L⁻¹.

O 2-metil-1-propanol foi significativamente maior ($P < 0,01$) nos tratamentos T1, T2 e T3, tratamentos estes sem a presença de leveduras selecionadas na fermentação alcoólica (*Tabela 11*). Estes valores foram semelhantes aos encontrados por RIZZON (1987). A concentração deste álcool superior situa-se entre 9,0 mg L⁻¹ e 148,0 mg L⁻¹ em vinhos tintos (CABANIS & CABANIS, 2000).

A concentração dos álcoois isoamílicos 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol foram maiores nos vinhos produzidos com leveduras selecionadas (*Tabela 11*). Estes se originam das vias metabólicas dos aminoácidos isoleucina e leucina, respectivamente (MARTÍNEZ et al., 1998). Segundo DELFINI et al. (1999), o atributo sensorial associado aos álcoois isoamílicos em suas diferentes formas isoméricas corresponde a notas picantes, às vezes indesejáveis em vinhos. A concentração máxima do 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol encontrada em vinho ficam em torno de 150,0 mg L⁻¹ e 490,0 mg L⁻¹, respectivamente (CABANIS & CABANIS, 2000).

DELAQUIS et al. (2000) apresentam a seguinte composição de vinho: 0,08 mg L⁻¹ de aldeído acético, 204,0 mg L⁻¹ de acetato de etila, 0,2 mg L⁻¹ de 1-propanol, 0,6 mg L⁻¹ de isobutanol, e 202,2 mg L⁻¹ de 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol. Já MARTÍNEZ et al. (1998) caracterizou vinhos a 163,0 mg L⁻¹ de aldeído acético, 23,0 mg L⁻¹ de acetato de etila, 15,0 mg L⁻¹ de 1-propanol, 27,0 mg L⁻¹ de isobutanol, e 236,0 mg L⁻¹ de 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol.

Segundo trabalho realizado por BOIDO et al. (2001), as principais diferenças encontradas em vinhos originados da fermentação maloláctica foram o aumento da concentração de lactato de etila, diminuição dos ésteres etílicos e acetatos, sendo que a mudança mais importante foi no teor de acetato de hexila e um pequeno incremento do 4-vinil guaiacol e 4-vinil fenol, incrementos esses abaixo do limiar de percepção.

Em resumo, os resultados encontrados para os álcoois superiores demonstraram que os tratamentos com leveduras naturais e a presença de bactérias selecionadas, favoreceram o aumento da concentração de 2-metil-1-propanol; em contrapartida, as concentrações de 1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol diminuíram.

4.2.16. Aminas bioativas

As concentrações de aminas bioativas encontradas no vinho Merlot encontram-se na *Tabela 12*. Além das aminas que estão listadas na tabela, outras aminas foram analisadas, porém não foram detectadas pela metodologia utilizada, sendo elas: tiramina, histamina, agmatina, espermina, feniletilamina e triptamina.

Não foi observada nenhuma diferença significativa ($P > 0,01$) nas concentrações de putrescina entre os tratamentos aplicados, mas cabe aqui, fazer alguns comentários pertinentes. Nos tratamentos de T1 a T4, com leveduras naturais e a presença de bactérias, não ocorreu a formação de putrescina. Ao serem adicionadas *S. bayanus* e *S. cerevisiae*, ocorreu a produção dessa amina nos tratamentos de T5 a T7 e de T9 a T11. Os tratamentos T8 e T12, que utilizaram a bactéria *L. plantarum*, não ocorreu a formação de aminas.

Para a cadaverina, a produção foi detectada nos tratamentos T6, T9 e T10. No tratamento T9 a concentração foi superior mesmo sem ocorrer diferença significativa ($P > 0,01$), indicando que nos outros tratamentos citados, as bactérias podem ter metabolizado a referida amina no seu metabolismo.

No caso da serotonina, a maior concentração encontrada foi no tratamento T8 (22,90 mg L⁻¹), sendo que no tratamento T1 (leveduras e bactérias naturais) não foi detectada de serotonina. Os tratamentos T3, T4, T5 e T12, também foram encontradas concentrações elevadas dessa amina, sendo que o T4 e o T12 foram aqueles que utilizaram a *L. plantarum*.

No caso da espermidina, a maior concentração foi no tratamento T8, não diferindo significativamente ($P > 0,01$) dos tratamentos T11 e T12. As concentrações encontradas foram relativamente pequenas, entre 0,85 mg L⁻¹ a 1,25 mg L⁻¹.

PILATTE (1998) estudando o comportamento da fermentação maloláctica no vinho Merlot e a produção de aminas bioativas, constatou que no vinho testemunha a concentração de aminas foi maior que o tratamento com bactéria *Oenococcus oeni*. Os valores, em mg L⁻¹, foram os seguintes: histamina (0,95 e 0,21), tiramina (nd e nd), putrescina (9,17 e 3,90), cadaverina (0,47 e 1,05), total de aminas bioativas (11,58 e 6,17), respectivamente.

TABELA 12. Concentração de aminas bioativas (mg L⁻¹) do vinho Merlot elaborado na safra 2001.

Tratamentos	Putrescina ¹	Cadaverina	Serotonina	Espermidina
T 1	Nd a	Nd a	Nd e	Nd c
T 2	Nd a	Nd a	1,95 de	Nd c
T 3	Nd a	Nd a	15,45 b	Nd c
T 4	Nd a	Nd a	14,35 b	Nd c
T 5	1,00 a	Nd a	11,40 b	Nd c
T 6	1,20 a	0,45 a	5,75 cd	Nd c
T 7	1,75 a	Nd a	6,00 cd	Nd c
T 8	Nd a	Nd a	22,90 a	1,25 a
T 9	0,75 a	0,90 a	4,40 cd	0,85 b
T 10	0,85 a	0,75 a	6,60 c	0,85 b
T 11	0,60 a	Nd a	4,70 cd	0,95 ab
T 12	Nd a	Nd a	13,65 b	1,05 ab
CV (%)	162,23	292,77	9,80	17,84

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Ao analisar vários vinhos de uma mesma cultivar de uva durante o processamento, VIDAL-CAROU et al. (1990a), encontraram a formação de aminas bioativas durante a fermentação alcoólica, com valores de 0,55 mg L⁻¹ e 0,95 mg L⁻¹ para histamina e tiramina, respectivamente. Em alguns casos a formação de tiramina foi evidenciada na fermentação alcoólica, mas, não foi observado esse mesmo comportamento para a histamina. Ao iniciar a fermentação maloláctica, seus valores foram aumentando, chegando no final com 2,10 mg L⁻¹ de histamina e 8,30 mg L⁻¹ de tiramina. Nesse mesmo trabalho, em vinhos elaborados com outra cultivar de uva, foram encontrados valores de 8,50 mg L⁻¹ e 4,35 mg L⁻¹ de histamina e tiramina,

respectivamente. Uma boa correlação foi estabelecida entre a formação de aminas e o aparecimento de ácido láctico no curso da fermentação maloláctica.

GERLAND & GERBAUX (1999) trabalhando com quatro bactérias lácticas selecionadas em seis tipos de vinhos, comprovaram a ocorrência da produção de diferentes concentrações de histamina nos vinhos. Em todos eles, a fermentação maloláctica realizada pela flora natural produziu concentrações variadas de histamina. Vários fatores são responsáveis pelos diferentes teores de aminas, entre eles, as concentrações de aminoácidos e a capacidade das bactérias em transformar os aminoácidos em aminas bioativas.

O dióxido de enxofre em altas concentrações pode inibir o desenvolvimento de microrganismos com atividade aminoácido descarboxilase. Segundo VIDAL-CAROU et al. (1990a), a formação de tiramina sofreu maior inibição que a histamina, na fermentação maloláctica, quando foram adicionadas doses mais elevadas de dióxido de enxofre.

Dentre as aminas pesquisadas, apenas a putrescina, serotonina, cadaverina e espermidina foram detectadas nas amostras. Todas estas aminas, com exceção da cadaverina foram detectadas em vinho Merlot da mesma região safra de 1999 (SOUZA, 2002). Entretanto, todas estas aminas já foram detectadas em vinhos (BAUCOM et al., 1986; GLÓRIA et al., 1998; OUGH, 1971).

Como pode ser observado na *Figura 9*, os teores totais de aminas variaram de não detectado (T1) a 24,15 mg L⁻¹ (T8). Estes teores são maiores que os encontrados em vinho Merlot da mesma região na safra 1999 (SOUZA, 2002), porém são menores que os valores descritos na literatura (GLÓRIA et al., 1998; ZEE et al., 1983).

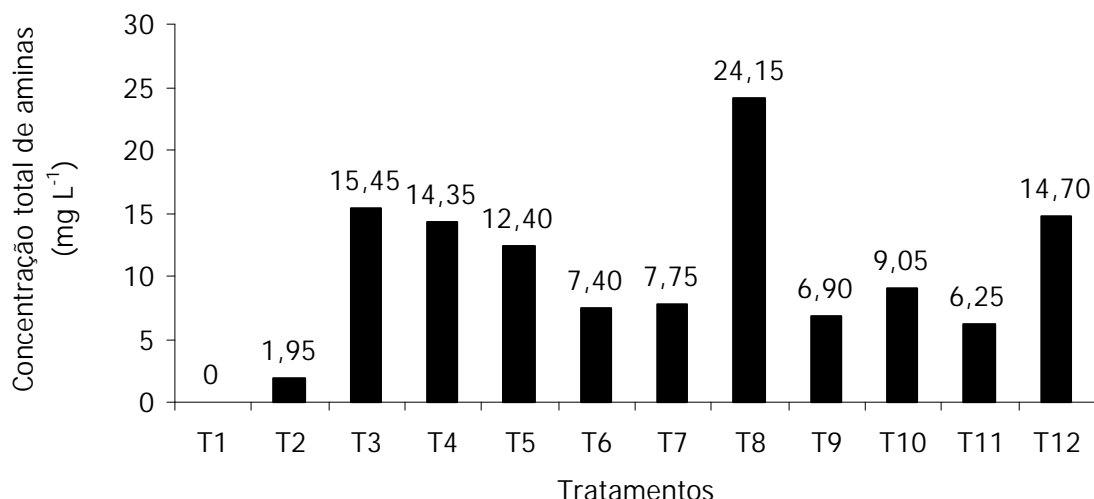


FIGURA 9. Teores totais de aminas bioativas em vinho Merlot elaborado na safra 2001.

Em todas as amostras analisadas, a serotonina foi a amina predominante, representando de 64% a 100% da concentração total. Esta amina pode ser formada pela descarboxilação do 5-hidroxi-triptofano (LIMA & GLÓRIA, 1999). Existem dados na literatura sobre a presença de serotonina em algumas frutas e hortaliças, dentre elas, banana, berinjela, tomate, café (STARLING, 1999) e em vinhos (GLÓRIA et al., 1998; SOUZA, 2002), entretanto, não foi encontrada informação sobre a sua origem no vinho. Nas amostras submetidas à fermentação alcoólica com *S. bayanus* (T5 a T7), a segunda amina predominante foi a putrescina, exceto nas amostras adicionadas de *L. plantarum* (T8). Entretanto, nas amostras adicionadas de *S. cerevisiae* (T9 a T11), a putrescina e a espermidina foram as aminas igualmente predominantes, exceto para putrescina em amostras adicionadas de *L. plantarum* (T12).

A serotonina foi encontrada em todos os tratamentos exceto o T1, com leveduras e bactérias naturais, seguido de putrescina (seis tratamentos), espermidina (cinco) e cadaverina (três tratamentos) (Figura 10).

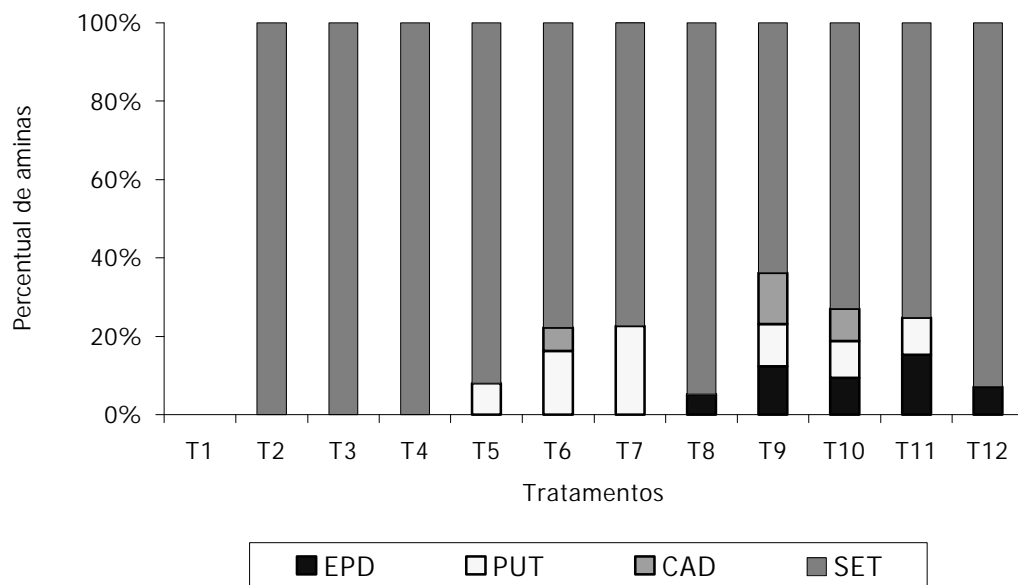


FIGURA 10. Contribuição percentual de cada amina em relação à concentração total de aminas em vinho Merlot elaborado na safra 2001.

A concentração média de aminas foi maior quando a fermentação alcoólica foi submetida com *S. bayanus* (Figura 11).

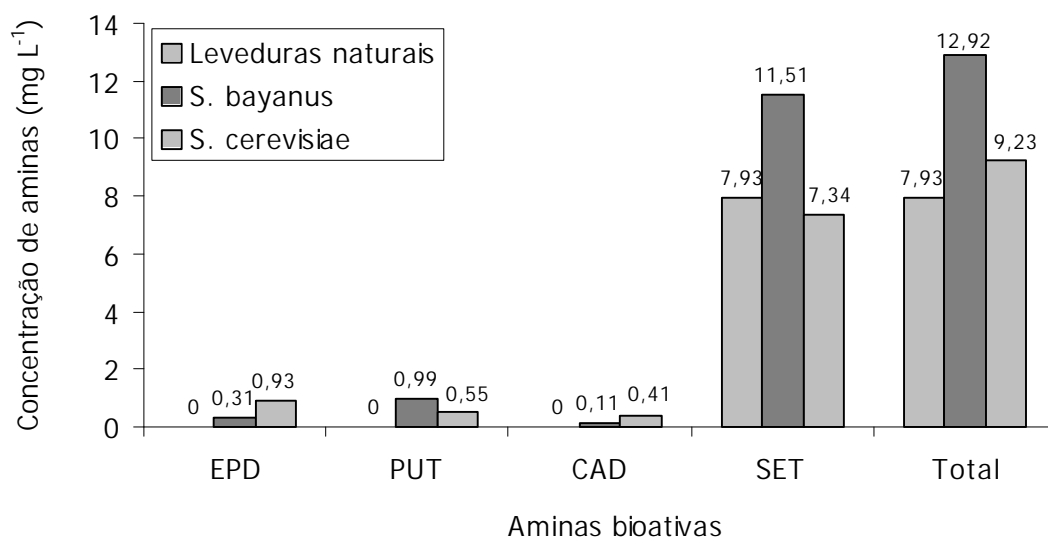


FIGURA 11. Influência do tipo de levedura na fermentação alcoólica e na concentração média de aminas bioativas (mg L^{-1}) em vinho Merlot elaborado na safra 2001.

A concentração média de aminas foi maior quando a fermentação maloláctica foi submetida com *L. plantarum*, sendo que a serotonina a mais encontrada. Nos demais tratamentos, a serotonina também obteve a maior concentração dentre as aminas (Figura 12).

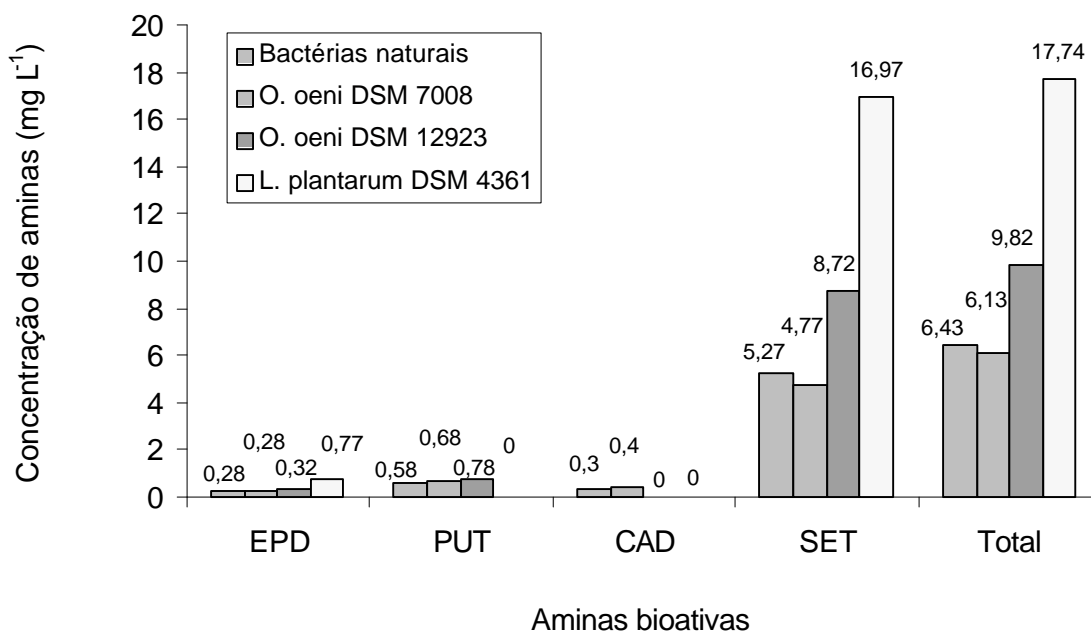


FIGURA 12. Influência do tipo de bactéria na fermentação maloláctica e a concentração média de aminas bioativas em vinho Merlot elaborado na safra 2001.

A presença de putrescina nas amostras pode estar associada ao seu acúmulo nas uvas devido a condições de estresse hídrico ou por deficiência de nutrientes, dentre eles o potássio no solo naquela safra (RADLER & FATH, 1991). O fato da putrescina ter sido encontrada apenas em amostras adicionadas de leveduras, sugerem que estas podem ter facilitado a extração de putrescina da uva. Neste caso, a ausência de putrescina nas amostras adicionadas de *L. plantarum*, sugere que esta espécie seja capaz de catabolizar ou fazer uso da putrescina disponível no meio.

A espermidina foi encontrada nas amostras adicionadas de *S. cerevisiae* e apenas na amostra adicionada de *S. bayanus* e *L. plantarum*. A espermidina é uma amina freqüentemente encontrada em tecidos, sendo a poliamina predominante em tecidos vegetais. Sua presença pode ser originária da uva, tendo sido transferida ao vinho por extração via atividade de *S. cerevisiae* e *L. plantarum*, ou ainda, pode ser

produzida por estes microrganismos para sua síntese protéica e crescimento (LIMA & GLÓRIA, 1999).

A cadaverina só foi encontrada em amostras adicionadas de *L. oenos* DSM 7008 e de amostras sem adição de bactéria malolática. A cadaverina esta geralmente associada à presença de enterobactérias (STRAUB, 1995). Estes resultados sugerem que pode ter ocorrido contaminação destas amostras por enterobactérias, ou que as bactérias naturais na amostra T9, possa ter permitido o crescimento de enterobactérias.

A ausência das aminas histamina e tiramina nas amostras de vinho, pode estar associada às condições higiênico-sanitárias utilizadas e às quantidades de sulfito adicionada. Além disto, estas aminas podem ainda não ter sido formadas, uma vez que são metabólitos secundários de várias espécies bacterianas, sendo normalmente produzidas na fase estacionária do crescimento.

4.3. Análise sensorial do vinho

O conhecimento da composição química detalhada do vinho, favorece a degustação, mas não é suficiente e nem a substitui. A análise sensorial avalia e define as características sensoriais do vinho, sua evolução, alterações, possíveis defeitos e eventualmente a presença de substâncias estranhas.

A análise sensorial do vinho em relação ao exame visual (*Tabela 13*) não apresentou diferenças significativas ($P > 0,01$) entre os tratamentos. Normalmente os vinhos apresentam-se límpidos após a estabilização tartárica. A intensidade de cor foi mediana, própria do vinho Merlot. Os vinhos elaborados por microvinificação, normalmente apresentam baixa intensidade de cor. A tonalidade desses vinhos permaneceu entre o vermelho vivo e o vermelho tijolo.

TABELA 13. Análise sensorial: exame visual do vinho Merlot elaborado na safra 2001.

EXAME VISUAL ¹			
Tratamentos	Limpidez	Intensidade	Tonalidade
T 1	2,48 a	2,36 a	3,18 a
T 2	3,13 a	2,75 a	2,98 a
T 3	3,48 a	2,97 a	2,73 a
T 4	3,68 a	2,99 a	3,01 a
T 5	3,93 a	3,10 a	2,48 a
T 6	3,99 a	2,96 a	2,84 a
T 7	4,02 a	3,11 a	3,11 a
T 8	3,80 a	2,84 a	2,92 a
T 9	3,89 a	2,98 a	3,23 a
T 10	4,01 a	2,89 a	3,40 a
T 11	3,53 a	2,77 a	3,41 a
T 12	3,70 a	2,70 a	3,70 a
CV (%)	30,83	30,08	37,21

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Os atributos avaliados pelo exame olfativo encontram-se na *Tabela 14*.

A intensidade, equilíbrio e qualidade do aroma sofreram diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os tratamentos e os aromas indesejáveis não sofreram diferenças significativas. Os valores encontrados neste experimento indicam que a utilização de diferentes leveduras e bactérias não influenciaram de forma relevante a qualidade olfativa dos vinhos, mesmo que os valores tenham indicado uma qualidade mediana. Os aromas indesejáveis, para a maioria dos tratamentos, foram baixos,

indicando que não foi devido a defeitos intrínsecos ao produto mas provavelmente devido à safra vitícola.

TABELA 14. Análise sensorial: exame olfativo do vinho Merlot elaborado na safra 2001.

EXAME OLFATIVO¹				
Tratamentos	Intensidade	Equilíbrio	Qualidade	Aromas Indesejáveis
T 1	2,50 ab	2,30 ab	2,16 ab	2,04 a
T 2	2,14 b	2,40 ab	2,45 ab	1,34 a
T 3	3,15 ab	2,66 ab	2,38 ab	2,04 a
T 4	3,20 ab	3,00 a	3,01 ab	1,28 a
T 5	2,66 ab	2,86 ab	3,07 a	0,96 a
T 6	2,81 ab	2,58 ab	2,58 ab	1,14 a
T 7	2,98 ab	2,38 ab	2,31 ab	1,58 a
T 8	3,40 a	2,61 ab	2,51 ab	1,33 a
T 9	2,70 ab	2,26 ab	2,34 ab	1,40 a
T 10	3,16 ab	2,16 ab	2,16 ab	1,86 a
T 11	2,99 ab	2,15 ab	2,00 b	2,00 a
T 12	2,86 ab	2,11 b	2,03 b	1,70 a
Cv (%)	34,10	31,12	37,18	89,97

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A fermentação maloláctica no vinho Pinot permitiu um aumento na sua qualidade e na complexidade dos aromas de frutas vermelhas e na análise gustativa, uma diminuição da acidez, adstringência e sensação alcoólica (THÉODORE & GERLAND, 1998). GERLAND & GERBAUX (1999) observaram que a fermentação

maloláctica aumentou o "score" de aromas frutados, diminuindo os aromas vegetais e herbáceos.

BOIDO et al. (2001) observaram uma diminuição significativa nos vinhos que realizaram a fermentação maloláctica de alguns descritores do grupo dos aromas frutais (framboesa e damasco) e do aroma vegetal fresco (pasto cortado), ao mesmo tempo detectaram incremento significativo dos termos descritivos passas de ameixa, manteiga (diacetil) e animal.

Quanto ao exame gustativo (*Tabela 15*), a intensidade, corpo, adstringência, acidez, equilíbrio e gostos indesejáveis não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,01$) e somente a qualidade gustativa teve diferenças significativas. Os vinhos elaborados por microvinificação, normalmente apresentam valores baixos de adstringência, corpo e gostos indesejáveis. Neste exame, prevaleceu as notas ácidas em relação às demais variáveis. A qualidade gustativa do vinho Merlot permaneceu abaixo da média em todos os tratamentos. A qualidade da uva, inadequada na safra 2001, pode ter influenciado a qualidade do vinho.

Os ácidos orgânicos intervêm na acidez condicionando a estabilidade, a cor e a aceitação gustativa do vinho. Todos esses ácidos que constituem a acidez, dão suporte aos aspectos sensoriais, espelhando também o estado higiênico das condições de produção do vinho. Quando um vinho contém muita acidez, apresenta uma agressividade intensa. Se o vinho possuir uma acidez insuficiente, torna-se frágil, falta de brilho, aromas olfativos, pouca intensidade gustativa e de cor pálida (CABANIS, 2000).

No trabalho desenvolvido por DELTEIL (2000), a fermentação maloláctica provocou uma melhora nos atributos sensoriais aromáticos e gustativos do vinho, como notas frutadas e diminuição da adstringência.

TABELA 15. Análise sensorial: exame gustativo do vinho Merlot elaborado na safra 2001.

EXAME GUSTATIVO¹				
Tratamentos	Intensidade	Corpo	Adstringência	Acidez
T 1	2,45 a	2,52 a	2,32 a	3,31 a
T 2	2,48 a	2,63 a	2,43 a	3,10 a
T 3	3,07 a	2,76 a	2,29 a	3,23 a
T 4	3,04 a	2,79 a	2,64 a	3,82 a
T 5	3,05 a	2,79 a	2,64 a	3,23 a
T 6	2,85 a	2,48 a	2,53 a	3,32 a
T 7	3,26 a	2,67 a	2,51 a	3,34 a
T 8	3,00 a	2,67 a	2,68 a	3,37 a
T 9	2,82 a	2,40 a	2,74 a	4,06 a
T 10	2,93 a	2,50 a	2,50 a	3,92 a
T 11	2,70 a	2,40 a	2,73 a	3,89 a
T 12	2,86 a	2,41 a	2,83 a	3,82 a
CV (%)	26,35	23,05	50,21	24,94

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

TABELA 15. *Continuação...*

EXAME GUSTATIVO¹			
Tratamentos	Equilíbrio	Qualidade	Gostos Indesejáveis
T 1	1,93 a	1,93 b	2,26 a
T 2	2,46 a	2,68 ab	0,99 a
T 3	2,76 a	3,01 a	0,92 a
T 4	2,54 a	2,91 a	1,15 a
T 5	2,73 a	2,96 a	0,93 a
T 6	2,55 a	2,69 ab	1,30 a
T 7	2,47 a	2,65 ab	1,70 a
T 8	2,59 a	2,74 ab	1,48 a
T 9	2,27 a	2,48 ab	1,38 a
T 10	2,52 a	2,45 ab	1,55 a
T 11	2,06 a	2,13 ab	1,89 a
T 12	2,32 a	2,40 ab	1,59 a
CV (%)	34,07	31,91	93,88

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

No exame olfato-gustativo (*Tabela 16*), o equilíbrio e a persistência não diferiram estatisticamente entre os tratamentos ($P > 0,01$). Para estas duas variáveis, os valores também ficaram abaixo da média, indicando um desequilíbrio do vinho. Em relação à qualidade geral, as notas variaram de 8,24 a 11,43 em uma escala de intensidade máxima igual a 20. Podemos, portanto, concluir que a qualidade geral do vinho Merlot, tanto olfativa quanto gustativa, atingiu valores

medianos para o vinho produzido, embora seja um vinho de grande potencial de qualidade.

TABELA 16. Análise sensorial: exame olfato-gustativo, característica varietal e qualidade geral do vinho Merlot elaborado na safra 2001.

Tratamentos	EXAME OLFATO-GUSTATIVO ¹		CARACTERÍSTICA VARIETAL	QUALIDADE GERAL
	Equilíbrio	Persistência	Tipicidade	Nota Final
T 1	2,04 a	2,56 a	2,15 a	8,24 b
T 2	2,48 a	2,48 a	2,57 a	10,19 ab
T 3	2,73 a	2,83 a	2,82 a	10,67 ab
T 4	2,78 a	2,81 a	2,74 a	10,38 ab
T 5	2,80 a	2,91 a	2,86 a	11,43 a
T 6	2,70 a	2,23 a	2,54 a	10,67 ab
T 7	2,55 a	2,72 a	2,58 a	11,05 ab
T 8	2,57 a	2,69 a	2,51 a	10,81 ab
T 9	2,47 a	2,37 a	2,33 a	9,52 ab
T 10	2,54 a	2,55 a	2,46 a	10,19 ab
T 11	2,27 a	2,25 a	2,13 a	8,95 ab
T 12	2,39 a	2,33 a	2,17 a	9,19 ab
CV (%)	35,32	42,20	39,13	24,19

¹ Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

5 - CONCLUSÕES

Na etapa de elaboração do vinho Merlot, acompanhando-se analiticamente as fermentações alcoólicas e maloláticas observou-se que as fermentações conduzidas com leveduras naturais, *S. cerevisiae* e *S. bayanus* tiveram comportamentos diferentes em algumas variáveis.

Os vinhos elaborados com *S. cerevisiae* permaneceram com a acidez total maior em relação aos demais tratamentos.

Em relação ao ácido láctico no final da fermentação alcoólica, a concentração foi maior nos tratamentos com *S. cerevisiae* que com *S. bayanus*, sendo que, nos tratamentos com leveduras naturais foi produzido maior concentração de ácido láctico.

Os efeitos positivos produzidos pela fermentação malolática foram à diminuição da acidez total e do ácido málico e aumento do pH e ácido láctico, sendo que o ponto negativo foi o aumento mais acentuado da acidez volátil.

L. plantarum provocou menor diminuição do pH e acidez total em relação às demais bactérias. A acidez volátil com *L. plantarum* foi menor nos tratamentos T4 (leveduras naturais) e T8 (*S. bayanus*).

O ácido málico foi mais rapidamente degradado por *L. plantarum* e *O. oeni* DSM 12923 nas fermentações com *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Em fermentações com leveduras naturais, foram a *O. oeni* DSM 12923 e *O. oeni* DSM 7008 as mais eficientes.

As leveduras naturais produziram maior concentração de acetato de etila, 2-metil-1-propanol e menor de 1-propanol, 2-metil-1-butanol em relação a *S. cerevisiae* e *S. bayanus*.

As aminas putrescina, cadaverina e espermidina não foram encontradas nos tratamentos com leveduras naturais mais *L. plantarum*, *O. oeni* DSM 12923 e *O. oeni* DSM 7008, apenas a serotonina foi encontrada nos tratamentos com leveduras naturais e as três espécies de bactérias. Putrescina, cadaverina, serotonina e espermidina foram encontradas somente nos tratamentos T9 e T10.

Na análise sensorial, os vinhos apresentaram limpidez brilhante e vermelho vivo, equilíbrio médio e poucos aromas, porém de baixa qualidade, com poucos aromas indesejáveis. Nas variáveis gustativas, o vinho Merlot apresentou valores medianos para intensidade e corpo, prevalecendo as notas ácidas, com baixo equilíbrio e gostos indesejáveis, caracterizando pouco a tipicidade varietal. Para os julgadores o vinho Merlot foi de média qualidade apontando como a principal causa, a baixa qualidade da matéria-prima.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. **Análisis de vinos y mostos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1976. 158p.

ARENA, M.E.; MANCA DE NADRA, M.C. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. **Soc. Applied Microbiology.**, v.90, p.158-162, 2001.

AUGUSTE, M.H. **Application de la chromatographie en phase liquide à haute pression à l'analyse des moûts et des vins**. Talence, 1979. 135p. Tese (Doutorado em Viticultura-Enologia), Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II.

AVILA, L.D. de. **Indução de fermentação maloláctica em vinhos Gewurztraminer e Cabernet Sauvignon**. 1995. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1995.

BARRE, P. La levadura de fermentación alcohólica. Cap.11.1. **In:** FLANZY, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

BAUCOM, T.L.; TABACCHI, M.H.; COTTRELL, T.H.E.; RICHMOND, B.S. Biogenic amine content of New York State wines. **Journal of Food Science**. v.51, n.5, p.1376-1377, 1986.

BAUMES, R. Aromas: Los constituintes volátiles de la etapa fermentativa. Cap.5. **In:** FLANZY, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

BERTRAND, A. **Recherches sur l'analyse des vins par chromatographie en phase gazeuse**. Talence, France, 1975. 291p. Tese (Doctorat en Chimie - Mention Biochimie) – Université de Bourdeaux II, 1975.

BISSON, L.F. Yeasts – metabolism of sugars. Capítulo 3. p.55-75. **In:** FLEET, G.H. Wine microbiology and biotechnology. Sydney: Harwood academic publishers. 1994. 510p.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Introdução a química de alimentos**. São Paulo: Varela, 2ª ed., 1992. 223p.

BOIDO, E.; CARRAU, F.M.; DELLACASSA, E. et al. Modificaciones en la composición aromática producidas por la fermentación maloláctica en los vinos Tannat y su evolución durante crianza. **In:** VIII Viticulture and Enology Latin-American Congress. Montevideo: noviembre de 2001.

BOULTON, R.B.; SINGLETON, V.L.; BISSON, L.F.; KUNKEE, R.E. **Principles and practices of winemaking**. Davis: CHAPMAN & HALL. 1996. 604p.

BOYONOVE, C.; BAUMES, R.; CROUZET, J.; GUNATA, Z. Aromas. Cap.5. **In:** FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. **In:** MARKAKIS, P. Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press, 1982. p.1-40.

BUIATTI, S.; BOSCHELLE, O.; MOZZON, M.; BATTISTUTTA, F. Determination of biogenic amines in alcoholic and non-alcoholic beers by HPLC. **Food Chemistry**. v.52, p.199-202, 1995.

CABANIS, J.C. Ácidos orgánicos, sustancias minerales, vitaminas y lípidos. Cap.1. **In:** FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

CABANIS, J.C.; CABANIS, M.T. Tablas de composición. Cap.8. **In:** FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

CAMEIRA-DOS –SANTOS, P.J.; BRILLOUET, J.M.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Detection and partial characterisation of new anthocyanin-derived pigments in wine. **Journal Science Food Agricultural**. v.70, p.204-208, 1996.

CARRAU, F.M.; DELLACASSA, E.; HENSCHKE, P.A. et al. Caracterización de *Saccharomyces cerevisiae* en relación a su habilidad para utilizar el nitrógeno – un nuevo concepto biotecnológico para la industria del vino. **In:** VIII Viticulture and Enology Latin-American Congress. Montevideo: noviembre de 2001.

CAVIN, J.F.; DIVIES, C.; GUZZO, J. Bacterias lácticas en enología: Las bacterias lácticas del vino. **In:** FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

CHARPENTIER, C. Tolérance à l'éthanol des levures: évaluation, mécanismes biochimiques. **Revue des Enologues**. n.73 S. 1994.

CHEYNIER, V.; TEISSEDRE, P.L. Tablas de composición. **In:** FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M.; SARNI-MANCHADO, P. Los compuestos fenólicos. **In:** FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

COOPER, T.G. Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. p.39-99. **In:** STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces* – Metabolism and gene expression. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982. 680p.

CROUZET, J. Aromas: Los constituyentes volátiles de la etapa prefermentativa. Cap.5. **In:** FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

CURVELO-GARCIA, A.S. **Controlo de qualidade dos vinhos**. Odivelas: PENTAEDRO, 1988, 420p.

DAVIS, C.; WIBOWO, D.; ESCHENBRUCH, R.; LEE, T.; FLEET, G.H. Practical implications of malolactic fermentation: A Review. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.36, n.4, p.290-301, 1985.

DELAQUIS, P.; CLIFF, M.; KING, M.; GIRARD, B.; HALL, J.; REYNOLDS, A. Effect of two commercial malolactic cultures on the chemical and sensory properties of Chancellor wines vinified with different yeasts and fermentation temperatures. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.51, n.1, p.42-48, 2000.

DELFINI, C.; COCITO, C.; BONINO, M. Mécanismes biochimiques et moléculaires chez *Saccharomyces cerevisiae* impliqués dans la formation de quelques composés volatils dans les vins. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**. v.33, n.4, p.195-211, 1999.

DELTEIL, D. La gestion pratique de la fermentation malolactique des vins rouges méditerranéens. **Revue des Enologues**. n.95, p.23-26, 2000.

DIRNINGER, N.; SCHAEFFER, A. Évolution des alcools supérieurs et du méthanol dans les eaux de vie de fruits produites dans le Nord-Est de la France. **Cahier Scientifique**. n.126, p.7-15, 1990.

DUTRA, S.V.; DAUDT, C.E.; SOUZA, M. Aminoácidos livres e uréia durante a fermentação de mosto de Chardonnay com diferentes leveduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.19, n.2, p.179-182, 1999a.

DUTRA, S.V.; DAUDT, C.E.; SOUZA, M. Aminoácidos livres e uréia durante a fermentação do mosto de Cabernet Sauvignon com diferentes leveduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.19, n.2, p.253-257, 1999b.

FERRANDO, R. Toxic amino acids, amines, nitrosamines. **Indian Food Pack**. v.40, n.2, p.13-22, 1986.

FEUILLAT, M. Los compostos nitrogenados. Cap.3. **In: FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

FIRME, M.P.; LEITÃO, M.C.; ROMÃO, M.V.S. The metabolism of sugar and malic acid by *Leuconostoc oenos*: effect of malic acid, pH and aeration conditions. **Journal of Applied Bacteriology**. v.76, p.173-181, 1994.

FLANZY, C. **Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

FLEET, G.H.; HEARD, G.M. Yeasts: Growth during fermentation. Chapter 2. **In: FLEET, G.H. Wine: Microbiology and Biotechnology**. Switzerland: Harwood Academic Publishers. 1ª edição, 1994. 510p.

FLEET, G.H. **Wine: Microbiology and Biotechnology**. Switzerland: Harwood Academic Publishers. 1ª edição, 1994. 510p.

FOURCASSIE, P.; MASSARD, E.M.K.; BELARBI, A.; MAUJEAN, A. Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos* strains in 18 media deficient in one amino acid. **Journal of Applied Bacteriology**. v.73, p.489-496, 1992.

FRANCIS, F.J. A new group of food colorants. **Trends in Science & Technology**. v.3, p.27-30, 1992.

FRONZA, D. **Efeito do etanol, sacarose e pH sobre a levedura etanológica isolada de mosto para a produção de aguardente**. 1997. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

GARCÍA, M.J.; ZÚÑIGA, M.; URUBURU, F. Revisión: El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v.32, n.3, p.233-268, 1992.

GERBAUX, V. Le point sur la maîtrise de la fermentation malolactique par l'ensemencement bactérien des vins. **Revue Française d'Enologie**. n.173, p.28-32, 1998.

GERLAND, C.; GERBAUX, V. Sélection d'une nouvelle souche de bactérie lactique: performances et impacts sur la qualité des vins. **Revue des Enologues**. n.93, p.17-19, 1999.

GLÓRIA, M.B.A.; WATSON, B.T.; SIMON-SARKADI, L.; DAESCHEL, M.A. A survey of biogenic amines in Oregon Pinot Noir and Cabernet Sauvignon wines. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.49, n.3, p.279-282, 1998.

GUNATA, Z. Aromas: Evolución de los constituyentes volátiles del vino durante la conservación. Cap.5. **In:** FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

HAJÓS, G.; SASS-KISS, A.; SZERDAHELYI, E.; BARDOCZ, S. Changes in biogenic amine content of Tokaj grapes, wines, and Aszu-wines. **Journal Food Science**. v.65, n.7, p.1142-1144, 2000.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Flórida: CRC Press. 1991. 312p.

HEARD, G.M., FLEET, G.H. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. **Journal of Applied Bacteriology**. v.65, p.23-28, 1988.

HENICK-KLING, T. Malolactic fermentation. Chapter 10. **In:** FLEET, G.H. **Wine: Microbiology and biotechnology**. Switzerland: Harwood Academic Publishers. 1ª edição, 1994. 510p.

HENSCHKE, P.A.; JIRANEK, V. Yeast - Metabolism of nitrogen compounds. Capítulo 4. p.77-164. **In:** FLEET, G.H. Wine microbiology and biotechnology. Sydney: Harwood academic publishers. 1994. 510p.

IZQUIERDO-PULIDO, M.; CARCELLER-ROSA, J-M.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Tyramine formation by *Pediococcus* spp. during beer fermentation. **Journal of Food Protection**. v.60, n.7, p.831-836, 1997.

IZQUIERDO-PULIDO, M.; FONT-FÀBREGAS, J.; CARCELLER-ROSA, J-M.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines changes related to lactic acid bacteria during brewing. **Journal of Food Protection**. v.59, n.2, p.175-180, 1996a.

IZQUIERDO-PULIDO, M.; FONT-FÀBREGAS, J.; VIDAL-CAROU, M.C. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* on histamine and tyramine formation during beer fermentation. **Food Chemistry**. v.54, p.51-54, 1995.

IZQUIERDO-PULIDO, M.; HERNÁNDEZ-JOVER, T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines in European beers. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. n.44, p.3159-3163, 1996b.

IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic Amines formation during malting and brewing. **Journal of Food Science**. v.59, n.5, p.1104-1107, 1994.

JACKMAN, R.L.; YADA, R.Y.; TUNG, M.A. SPEERS, R.A. Anthocyanins as food colorants – A Review. **Journal of Food Biochemistry**. v.11, p.201-247, 1987.

JENSON, I.; RICHARDSON, D. Les différences de production d'alcool en fonction des souches de levures: Mythe ou réalité ? **Revue des Enologues**. n.92, p.15-16, 1999.

JIMÉNEZ, J.; BENITEX, T. Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, D.C., v.35, n.5, p.1196-1198, 1987.

KALAC, P.; HLAVATÁ, V.; KRIZEK, M. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. **Food Chemistry**. v.58, n.3, p.209-214, 1997.

KANNY, G.; GERBAUX, V. Les amines biogènes dans les vins de Bourgogne. 2^{ème} partie: rôle de l'histamine dans l'intolérance aux vins. **Revue Française d'Enologie**. n.184, 2000.

KLIEWER, W.M. Changes in the concentration of free amino acids in grape berries during maturation. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.19, p.166-174, 1968.

LALLEMAND WINEMAKING UPDATE. **La prévention des arrêts de fermentation**. n.1 1998. 2p.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Editora Sarvier, 1995. 725p.

LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.33, n.1, p.70-79, 1999.

LONVAUD-FUNEL, A.; JOYEUX, A. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. **Journal of Applied Bacteriology**. v.77, p.401-407, 1994.

LONVAUD-FUNEL, A. Les levains malolactiques. Bases scientifiques et principes d'utilisation. **Vigne et Vin Publications Internationales**. v.33, p.35-40, 2001.

LONVAUD-FUNEL, A. Understanding wine lactic acid bacteria. Progress and prospects in controlling wine quality. **Proceedings of the 50th Anniversary Annual Meeting, Seattle, Washington**. p.278-284, 2000.

MAFRA, I.; HERBERT, P.; SANTOS, L.; BARROS, P.; ALVES, A. Evaluation of biogenic amines in some portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.50, n.1, p.128-132, 1999.

MANFROI, L. **Características biológicas e enológicas da videira Cabernet Franc conduzida no sistema lira aberta**. 1997. 138p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

MARTINEAU, B.; HENICK-KLING, T. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. **Journal of Applied Bacteriology**. v.78, p.526-536, 1995.

MARTÍNEZ, P.; VALCÁRCEL, M.J.; PÉREZ, L.; BENÍTEZ, T. Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeast during fermentation and biological aging of fino sherry: by-products and aroma compounds. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.49, n.3, p.240-250, 1998.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.35, n.4, p.341-371, 1995.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**. n.25, p.207-225. 1987.

MEYER, C.R.; LEYGUE-ALBA, N.M.R. **Manual de métodos analíticos enológicos**. Caxias do Sul: UCS, 1991. 51p.

MONTEIRO, F.F.; BISSON, L.F. Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.42, n.1, p.47-57, 1991.

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN. **Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts**. Paris: O.I.V., 1990. 368p.

OUGH, C.S. Measurement of histamine in California wines. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.19, p.241-244, 1971.

PALADINO, S.C.; GALIOTTI, H.C.; FORMENTO, J.C. Efecto de la fermentación maloláctica sobre el color de los vinos tintos. **In: VIII Viticulture and Enology Latin-American Congress**. Montevideo: novembro de 2001.

PARONETTO, L. **Polifenoli e tecnica enologica**. Milano: Edagricole, 1977. 324p.

PEYNAUD, É. **Enología práctica: conocimiento y elaboracion del vino**. 2ª edição. Madrid: Mundi-Prensa, 1984. 405p.

PILATTE, E. Maîtrise da la fermentation malolactique: Mieux gérer et anticiper. **Revue des Enologues**. n.88, p.21-22, 1998.

PILATTE, E.; NIELSEN, J.C. Mise au point d'un nouveau ferment malolactique à ensemencement direct pour les vins blancs. **Revue des Enologues**. n.93, p.15-19, 1999.

PILATTE, E.; NYGAARD, M. Développement d'un activateur spécifique des bactéries malolactiques. **Revue des Enologues**. n.92, p.31-33, 1999.

PRAHL, C.; NIELSEN, J.C.; PILATTE, E. Nouveaux développements pour la maîtrise de la fermentation malolactique: Sélection de souches de *Leuconostoc oenos* pour l'inoculation directe du vin. **Revue des Enologues**. n.73S, p.49-52, 1994.

PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I. **Brewing microbiology**. 2^a edição. London: Chapman & Hall. 1996. 306p.

PRIETO, C.; OÑATE, T.; PEÑA-NEIRA, A. Evaluacion de una bacteria lactica comercial inoculada en tres etapas de la fermentacion alcoholica. **In: VIII Viticulture and Enology Latin-American Congress**. Montevideo: novembro de 2001.

RADLER, F.; FATH, K.P. Histamine and other biogenic amines in wines. **In: Proceeding of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine**. American Society Enology and Viticulture, Davis. Califórnia: J.M. Rantz, 1991. P.185-195.

RAINIERI, S.; ZAMBONELLI, C.; TINI, V.; CASTELLARI, L.; GIUDICI, P. The enological traits of thermotolerant *Saccharomyces* strains. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.49, n.3, p.319-324, 1998.

RANKINE, B. **Manual práctico de enología**. Zaragoza: Editorial Acribia. 2000. 394p.

REED, G.; PEPLER, H.J. **Yeast technology**. Westport: AVI, 1973. 378p.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P. et al. **Sciences et techniques du vin**. Paris: Ed. Dunod, 1976. v.1, 671p.

RIBÉREAU-GAYON, P. New developments in wine microbiology. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.36, n.1 p.1-10, 1985.

RIO GRANDE DO SUL. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria Estadual da Agricultura e Abastecimento. Departamento de Produção Vegetal. **Cadastro Vinícola do Rio Grande do Sul, 2001/2002**. Porto Alegre, RS. SAA/DPV/DIVISÃO DE ENOLOGIA/IBRAVIN. 2002. Cd.

RIZZON, L.A.; GATTO, N. **Composição química dos vinhos da microrregião homogênea vinicultora de Caxias do Sul (MRH 311) - Compostos Voláteis**. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 1987. p.1-4. (Comunicado Técnico, n.5).

RIZZON, L.A. **Incidence de la macération sur la composition chimique des vins**. Talence, France, 1985. 225p. Tese (Doctorat en Oenologie, Ampélogie) – Université de Bourdeaux II, 1985.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Acidez na vinificação em tinto das uvas Isabel, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc. **Ciência Rural**. v.32, n.3, p.511-515, 2002.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Avaliação de cv. Cabernet Franc para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.21, n.2, p.249-255, 2001.

RIZZON, L.A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. **Avaliação enológica de algumas cultivares de videira**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 1986. 11p. (PNP Vitivinicultura. Projeto 020.86.001/1).

RIZZON, L.A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Efeito da relação das fases líquida e sólida da uva na composição química e na característica sensorial do vinho Cabernet. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.19, n.3, p.424-428, 1999.

RIZZON, L.A.; ZANUZ, M.C.; MIELE, A. Efeito da fermentação maloláctica na composição do vinho tinto. **Ciência Rural**. v.27, n.3, p.497-500, 1997.

RIZZON, L.A.; ZANUZ, M.C.; MIELE, A. Evolução da acidez durante a vinificação de uvas tintas de três regiões vitícolas do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.18, n.2, p.179-183, 1998.

SALMON, J.M. La levadura de fermentación alcohólica: Relaciones levadura-medio. Cap.11.1. **In: FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**. Madrid: Ediciones A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. 1ª edición, 2000. 783p.

SIQUEIRA, R.S. de. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: Serviço de produção e Informação, 1995. 159p.

SMITH, M.Th.; YARROW, D. Yeast. p.222-234 **In: SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-borne fungi**. CBS: 5ª edição. 199_.

SOLEAS, G.J.; CAREY, M.; GOLDBERG, D.M. Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines. **Food Chemistry**. v.64, p.49-58, 1999.

SOUZA, S.C. de. **Teores de metanol, amins bioativas, uréia e outros parâmetros físico-químicos em vinhos tintos brasileiros Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e Merlot**. 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

STARLING, M.F.V. **Perfil e teores de aminas biogênicas em algumas hortaliças**. 1998. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

THÉODORE, D.; GERLAND, C. La fermentation malolactique: connaissances actuelles et prospectives. **Revue des Enologues**. n.88, p.27-29, 1998.

USSEGLIO-TOMASSET, L. **Química enológica**. 4ª edição. Madrid: Ediciones Mundi Prensa, 1998. 400p.

VALE, S.R.; GLÓRIA, M.B.A. Methodology for the determination of biogenic amines in cheese. **J. AOAC. Int.**, v.80, n.5, p.1006-1012, 1997.

VAZQUEZ-LASA, M.B.; IÑIGUEZ-CRESPO, M.; GONZÁLES-LARRAINA, M.; GONZÁLES-GUERRERO, A. Biogenic amines in Rioja wines. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.49, n.3, p.229, 1998.

VERSARI, A.; PARPINELLO, G.P.; CATTANEO, M. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. **Journal of industrial Microbiology & Biotechnology**. v.23, p.447-455, 1999.

VIDAL-CAROU, M.C.; AMBATLLE-ESPUNYES, A.; ULLA-ULLA, M.C.; MARINÉ-FONT, A. Histamine and tyramine in Spanish Wines: their formation during the winemaking process. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.41, n.2, p.160-167, 1990a.

VIDAL-CAROU, M.C.; CODONY-SALCEDO, R.; MARINÉ-FONT, A. Histamine and tyramine in Spanish Wines: relationship with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malolactic fermentation intensity. **Food Chemistry**. v.35, p.217-227, 1990b.

VOGT, E.; JAKOB, L.; LEMPERLE, E.; WEISS, E. **El vino: obtención, elaboración y análisis**. Zaragoza: Editorial ACRIBIA. 1984. 294p.

VON ELBE, J.H.; SCHWARTZ, S.J. Colorants. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3ª ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.651-722.

ZEE, J.A.; SIMARD, R.E.; et al. Biogenic amines in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.34, n.2, p.6-9, 1983.

WIBOWO, D.; ESCHENBRUCH, R.; DAVIS, C.R. et al. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.36, n.4, p.302-313, 1985.

7 – APÊNDICE

Apêndice 1. Ficha da análise sensorial do vinho Merlot elaborado na safra 2001.
Bento Gonçalves, RS.

DATA:
DEGUSTADOR:
AMOSTRA:

EXAME VISUAL	1. LIMPEDEZ	Turvo	Velado	Brilhante
	2. INTENSIDADE	Fraca	Média	Forte
	3. TONALIDADE	Verm.-Violáceo	Verm.-Vivo	Verm.-Tijolo
EXAME OLFATIVO	4. INTENSIDADE	Fraca	Moderada	Intensa
	5. EQUILÍBRIO	Baixo	Médio	Alto
EXAME GUSTATIVO	6. QUALIDADE	Nenhuma	Média	Alta
	7. AROMAS INDESEJÁVEIS	nexistente	Moderado	Acentuado
	8. INTENSIDADE	Fraca	Moderada	Intensa
EXAME GUSTATIVO	9. CORPO	Delgado	Moderado	Denso
	10. ADSTRINGÊNCIA	Inexistente	Moderada	Forte
	11. ACIDEZ	Chato	Fresco	Ácido
	12. EQUILÍBRIO	Baixo	Médio	Alto
EXAME OLFATO-GUSTATIVO	13. QUALIDADE	Nenhuma	Média	Alta
	14. GOSTOS INDESEJÁVEIS	Inexistente	Moderado	Acentuado
	15. EQUILÍBRIO	Baixo	Médio	Alto
CARACTERÍSTICA VARIETAL	16. PERSISTÊNCIA	Fugaz	Média	Prolongada
	17. TIPICIDADE	Nenhuma	Média	Alta
	DEFEITUOSO	1-2		

QUALIDADE GERAL	ABAIXO DA MÉDIA	3-7	<input type="text"/>
	MÉDIA	8-13	
	ACIMA DA MÉDIA	14-18	
	ALTA	19-20	

COMENTÁRIOS:

Apêndice 2.

TABELA 17. Equações de regressão da densidade durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot.

Tratamentos	Modelo	Constante	Tempo	R ²
1	Raiz Quadrada	1,07156	$(- 0,0301934 \sqrt{x}) + 0,00271539$	0,88
2	Raiz Quadrada	1,07171	$(- 0,0299132 \sqrt{x}) + 0,00267092$	0,89
3	Raiz Quadrada	1,07089	$(- 0,0297487 \sqrt{x}) + 0,00266118$	0,89
4	Raiz Quadrada	1,07162	$(- 0,0300789 \sqrt{x}) + 0,00272407$	0,87
5	Raiz Quadrada	1,07108	$(- 0,0301123 \sqrt{x}) + 0,00271217$	0,87
6	Raiz Quadrada	1,06995	$(- 0,0297463 \sqrt{x}) + 0,00268547$	0,87
7	Raiz Quadrada	1,07172	$(- 0,0303868 \sqrt{x}) + 0,00273961$	0,87
8	Raiz Quadrada	1,07128	$(- 0,0303456 \sqrt{x}) + 0,00274221$	0,87
9	Raiz Quadrada	1,06952	$(- 0,0290096 \sqrt{x}) + 0,00261131$	0,87
10	Raiz Quadrada	1,07104	$(- 0,0295769 \sqrt{x}) + 0,00266150$	0,87
11	Raiz Quadrada	1,07060	$(- 0,0294386 \sqrt{x}) + 0,00264854$	0,87
12	Raiz Quadrada	1,07127	$(- 0,0297757 \sqrt{x}) + 0,00268733$	0,87

TABELA 18. Equações de regressão do pH durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot.

Tratamentos	Modelo	Constante	Tempo	R ²
1	Quadrático	3,24271	$0,0101793X - 0,000121786X^2$	0,67
2	Quadrático	3,24015	$0,00831832X - 0,0000970591X^2$	0,61
3	Quadrático	3,24259	$0,00972076X - 0,000119028X^2$	0,69
4	Quadrático	3,26871	$0,00730154X - 0,0000978708X^2$	0,57
5	Quadrático	3,24054	$0,00979230X - 0,000113746X^2$	0,64
6	Cúbico	3,26342	$0,00253349X + 0,000227394X^2 - 0,00000378315X^3$	0,77
7	Cúbico	3,27522	$0,000319699X + 0,000293368X^2 - 0,00000430384X^3$	0,72
8	Quadrático	3,27789	$0,00922884X - 0,000119735X^2$	0,77
9	Cúbico	3,25206	$- 0,00271708X + 0,000424118X^2 - 0,00000580063X^3$	0,93
10	Cúbico	3,26505	$0,00322371X + 0,000421705X^2 - 0,00000561618X^3$	0,72
11	Cúbico	3,26287	$- 0,00418299X + 0,000456900X^2 - 0,00000601669X^3$	0,81
12	Quadrático	3, 25554	$0,00908974X - 0,000123996X^2$	0,82

TABELA 19. Equações de regressão da acidez total durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot.

Tratamentos	Modelo	Constante	Tempo	R ²
1	Raiz Quadrada	115,747	$(- 8,49657 \sqrt{x}) + 0,443411$	0,93
2	Quadrático	106,263	$- 0,863887X + 0,00595988X^2$	0,87
3	Quadrático	104,096	$- 0,961141X + 0,00711562X^2$	0,84
4	Cúbico	111,795	$- 2,00499X + 0,0757411X^2 - 0,000810881X^3$	0,81
5	Linear	107,096	$- 0,573435X$	0,89
6	Linear	104,255	$- 0,543040X$	0,90
7	Linear	106,736	$- 0,586207X$	0,92
8	Raiz Quadrada	110,264	$(- 8,01341 \sqrt{x}) + 0,518057$	0,85
9	Linear	114,707	$- 0,427586X$	0,94
10	Cúbico	110,933	$0,834745X - 0,0457144X^2 + 0,000424298X^3$	0,99
11	Linear	117,536	$- 0,485313X$	0,86
12	Linear	110,597	$- 0,307280X$	0,86

TABELA 20. Equações de regressão do acidez volátil durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot.

Tratamentos	Modelo	Constante	Tempo	R ²
1	Quadrático	2,97086	$0,213006X - 0,00166470X^2$	0,94
2	Quadrático	2,86779	$0,213021X - 0,00166202X^2$	0,95
3	Raiz Quadrada	2,09223	$(0,970795\sqrt{x}) + 0,0131948$	0,97
4	Raiz Quadrada	2,50042	$(0,945307\sqrt{x}) - 0,0215842$	0,98
5	Linear	3,17065	$0,0979821X$	0,96
6	Quadrático	2,49279	$0,166545X - 0,00114395X^2$	0,95
7	Linear	2,94889	$0,0970370X$	0,95
8	Quadrático	2,72954	$0,145956X - 0,00118610X^2$	0,92
9	Quadrático	2,56603	$0,157697X - 0,00118221X^2$	0,97
10	Linear	3,32935	$0,0834994X$	0,92
11	Quadrático	2,62310	$0,161047X - 0,00137311X^2$	0,96
12	Quadrático	2,83144	$0,137959X - 0,000998143X^2$	0,98

TABELA 21. Equações de regressão do nitrogênio total durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot.

Tratamentos	Modelo	Constante	Tempo	R ²
1	Raiz Quadrada	1133,45	$(- 267,785 \sqrt{x}) + 20,5015$	0,95
2	Raiz Quadrada	1078,03	$(- 279,274 \sqrt{x}) + 22,9130$	0,95
3	Raiz Quadrada	1168,24	$(- 310,593 \sqrt{x}) + 26,0824$	0,93
4	Raiz Quadrada	1020,98	$(- 236,239 \sqrt{x}) + 18,9496$	0,90
5	Raiz Quadrada	1109,12	$(- 248,430 \sqrt{x}) + 19,4722$	0,95
6	Raiz Quadrada	1192,89	$(- 275,265 \sqrt{x}) + 21,7822$	0,94
7	Raiz Quadrada	1139,82	$(- 274,597 \sqrt{x}) + 22,5196$	0,92
8	Raiz Quadrada	1157,22	$(- 271,284 \sqrt{x}) + 22,6136$	0,91
9	Raiz Quadrada	1040,33	$(- 248,639 \sqrt{x}) + 21,3012$	0,86
10	Raiz Quadrada	1131,77	$(- 288,369 \sqrt{x}) + 24,4498$	0,85
11	Raiz Quadrada	1156,24	$(- 295,092 \sqrt{x}) + 25,0094$	0,88
12	Raiz Quadrada	1096,43	$(- 266,099 \sqrt{x}) + 22,6610$	0,85

TABELA 22. Equações de regressão do ácido málico durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot.

Tratamentos	Modelo	Constante	Tempo	R ²
1	Quadrático	3,67849	$- 0,118374X + 0,00093333X^2$	0,97
2	Cúbico	3,46308	$0,0302349X - 0,00571601X^2 + 0,0000702990X^3$	0,99
3	Quadrático	3,51963	$- 0,127174X + 0,00112264X^2$	0,92
4	Quadrático	3,52782	$- 0,695813X + 0,0344062X^2$	0,96
5	Quadrático	3,59839	$- 0,0269768X - 0,000534512X^2$	0,99
6	Linear	3,42002	$- 0,0587969X$	0,96
7	Cúbico	3,35748	$0,0795216X - 0,00737781X^2 + 0,0000846639X^3$	0,94
8	Quadrático	3,50939	$- 0,139773X + 0,00134263X^2$	0,99
9	Linear	3,84506	$- 0,0668774X$	0,90
10	Linear	3,966041	$- 0,0675172X$	0,94
11	Cúbico	3,38166	$0,0413211X - 0,00584032X^2 + 0,0000696235X^3$	0,94
12	Quadrático	3,64802	$- 0,159494X + 0,00164672X^2$	0,98

TABELA 23. Equações de regressão do ácido láctico durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot.

Tratamentos	Modelo	Constante	Tempo	R ²
1	Quadrático	2,83831	$0,0978442X - 0,000657168X^2$	0,90
2	Quadrático	2,91384	$0,124927X - 0,00122103X^2$	0,99
3	Quadrático	2,49644	$0,117964X - 0,00104902X^2$	0,99
4	Raiz Quadrada	2,36552	$(1,29473\sqrt{x}) - 0,0874791$	0,99
5	Linear	1,93777	$0,0678885X$	0,95
6	Linear	2,08424	$0,0709214X$	0,97
7	Linear	1,88231	$0,0865525X$	0,92
8	Raiz Quadrada	2,11662	$(0,927944\sqrt{x}) - 0,0512594$	0,99
9	Quadrático	2,25139	$0,135246X - 0,00104029X^2$	0,99
10	Linear	2,45854	$0,0806628X$	0,93
11	Quadrático	2,38975	$0,147404X - 0,00129982X^2$	0,98
12	Quadrático	2,83817	$0,136363X - 0,00113725X^2$	0,98

TABELA 24. Equações de regressão do ácido tartárico durante as fermentações alcoólica e maloláctica do vinho Merlot.

Tratamentos	Modelo	Constante	Tempo	R²
1	Linear	8,09721	- 0,0551505X	0,92
2	Linear	6,53503	- 0,0207707X	0,52
3	Linear	5,70434	- 0,00134170X	0,50
4	Linear	5,80174	- 0,00534384X	0,38
5	Linear	5,83520	- 0,00539397X	0,41
6	Linear	6,50839	- 0,0166876X	0,68
7	Linear	6,31928	- 0,0130660X	0,59
8	Linear	8,43899	- 0,0588074X	0,86
9	Linear	7,66849	- 0,0353276X	0,69
10	Linear	6,89319	- 0,0198679X	0,70
11	Linear	8,60135	- 0,0636456X	0,88
12	Linear	8,28436	- 0,0568056X	0,88